

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de
andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e
a conservação da espécie**

Andréa Raposo

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba

2007

Andréa Raposo
Bióloga

**Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba
(*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo
e a conservação da espécie**

Orientadora:
Prof^a Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Raposo, Andréa

Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie / Andréa Raposo. - - Piracicaba, 2007.
150 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Conservação biológica 2. Genética de populações 3. Marcador molecular 4. Rutales 5. Variação genética em plantas I. Título

CDD 633.88325

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

"A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento."

Platão

DEDICO

À Emerson Magno, com todo meu amor.

Aos meus pais.

Aos meus sobrinhos Bruno, Evelin, Felipe, Leonardo e Luiz Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e ao Instituto Internacional de Educação do Brasil (IEB), pelo apoio financeiro para este projeto.

Ao meu marido, Emerson, pelo grande auxílio na confecção dos mapas e formatação deste trabalho, mas principalmente por ter suportado toda minha ausência, pelos momentos que não vivemos, pela grande paciência e por sempre estar me apoiando e amando.

Ao meu pai José Joaquim e a minha mãe Lindaura, pelo apoio incondicional, amor e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, a todos os seus professores pelos conhecimentos transmitidos.

À Embrapa Acre que me concedeu todo auxílio nas viagens de coleta das amostras e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial ao Laboratório de Genética Vegetal que me deu todas as condições técnicas e disponibilidade de material para realização deste trabalho.

A professora Elizabeth Ann Veasey, pela confiança, pela orientação segura, pela dedicação em todas as fases deste trabalho e pela amizade. Muito obrigada!!!

Aos funcionários do Departamento de Genética em especial: Sílvia, Carlão, Berdan e Fernandinho, pelo carinho e a Léia e Glória pela pronta ajuda.

À Pesquisadora da Embrapa Acre Lúcia Helena de O. Wadt, pela amizade e pelo apoio no decorrer deste trabalho.

A todos os funcionários da Embrapa Acre, em especial a Aldeci da Silva Oliveira pelo grande auxílio na coleta das amostras, pelos igarapés e “pinguelas” que me ensinou atravessar e pela inestimável ajuda por estas matas que andamos.

A Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Ana Y. Ciampi, pelo carinho, amizade, apoio e auxílio no laboratório.

À todos os pesquisadores do Laboratório de Genética Vegetal, em especial a pesquisadora Marília pelo grande auxílio com o uso do seqüenciador.

Aos amigos do Laboratório de Genética Vegetal, Eva, Marco, Juliano, Manuela, Andréa, em especial a Yamá e Bete que sempre alegraram meus dias em Brasília.

Ao pessoal do IEB em especial a Janilda, pela atenção dispensada.

À querida Dona Maria, pelo grande carinho dispensado nos meses que fiquei em Brasília.

À Camila, cuja presença sempre me trouxe muita luz, pela grande amizade e pelo carinho.

À grande amiga e irmã, Maria Rita, por todo o carinho e força em todos os momentos da minha vida.

À todos os amigos do curso de Genética e Melhoramento de Plantas em especial: Luiz Hanai e Marcelo pelo companheirismo e amizade.

Ao amigo Jair, pela grande amizade, pelas horas de estudo e por estar sempre disposto a me ajudar. Valeu!!!

Às meninas “Super Poderosas” Larissa, Helen e Maria Eugênia, pela amizade e pelas hospedagens.

Ao Professor Paulo Kageyama pelas idéias.

Às amigas do LARGEA, Andréia, Elza e Tânia, pela amizade e carinho.

À Maria Zucchi e Vânia pelos ensinamentos e pela pronta ajuda nos que momentos que precisei.

À Karina pela ajuda inestimável na revisão deste trabalho, pela grande disponibilidade, paciência, sugestões e também pela grande amizade.

À Christie Klimas por ter dividido comigo suas “andirobas” e pela amizade.

Ao Seringueiro Senhor Diogo pela hospedagem e pelas andanças pelas matas do Seringal Caquetá.

À Profa. Rossana Correa Netto de Melo, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, por ter me iniciado na vida científica e pelos ensinamentos que trago comigo até hoje.

Ao pesquisador da Embrapa Dr. João Alencar de Sousa, que tanto contribuiu para meu crescimento profissional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço também ao Soneca, por ter suprido em parte as minhas longas ausências.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Revisão de Literatura.....	15
1.1.1 A Floresta Amazônica.....	15
1.1.2 Características da andiroba (<i>Carapa guianensis</i>).....	16
1.1.3 Diversidade genética.....	19
1.1.4 Manejo e conservação em espécies arbóreas.....	21
1.1.5 Estrutura genética espacial.....	24
1.1.6 Fluxo gênico em populações naturais.....	26
1.1.7 Marcadores microssatélites (SSR) sua utilização em <i>C. guianensis</i>	29
Referências.....	32
2 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE ANDIROBA (<i>Carapa guianensis</i> AULB., MELIACEAE).....	42
Resumo.....	42
Abstract	43
2.1 Introdução.....	44
2.2 Desenvolvimento.....	46
2.2.1 Material e Métodos.....	46
2.2.1.1 Área de estudo.....	46
2.2.1.2 Extração do DNA e análise genética.....	46
2.2.1.3 Análise estatística.....	50
2.2.1.3.1 Avaliação dos locos.....	50
2.2.1.3.2 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	51
2.2.1.3.3 Desequilíbrio genotípico entre pares de locos.....	51
2.2.1.3.4 Diversidade genética intrapopulacional.....	52
2.2.1.3.5 Estrutura genética.....	53
2.2.1.3.6 Análise de deriva genética.....	54
2.2.2 Resultados.....	55
2.2.2.1 Diversidade genética.....	55

2.2.2.2 Estrutura genética.....	59
2.2.3 Discussão.....	63
2.3 Conclusões.....	66
Referências.....	66
3 ESTRUTURA GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL DE <i>Carapa guianensis</i> (AUBLET.), ESPÉCIE ARBÓREA DA FLORESTA AMAZÔNICA.....	72
Resumo.....	72
Abstract.....	73
3.1 Introdução.....	75
3.2 Desenvolvimento.....	78
3.2.1 Material e Métodos.....	78
3.2.1.1 Área de estudo.....	78
3.2.1.2 Coleta das amostras.....	78
3.2.1.3 Extração do DNA.....	81
3.2.1.4 Análises genéticas.....	83
3.2.1.5 Análise estatística.....	85
3.2.1.5.1 Avaliação dos locos.....	85
3.2.1.5.2 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	85
3.2.1.5.3 Desequilíbrio genotípico entre pares de locos.....	86
3.2.1.5.4 Diversidade genética.....	86
3.2.2 Resultados.....	88
3.2.2.1 Amostragem e caracterização dos locos.....	88
3.2.2.2 Variabilidade genética.....	92
3.2.3 Discussão.....	100
3.2.3.1 Caracterização dos locos.....	101
3.2.3.2 Variabilidade genética.....	107
3.3 Conclusões.....	110
Referências.....	110
4 ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL INTRAPOPULACIONAL E TESTE DE PATERNIDADE EM <i>Carapa guianensis</i> (AUBLET.), EM UMA REGIÃO NÃO EXPLORADA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.....	117

Resumo.....	117
Abstract	118
4.1 Introdução.....	120
4.2 Desenvolvimento.....	122
4.2.1 Material e Métodos.....	122
4.2.1.1 Área de estudo.....	122
4.2.1.2 Coleta das amostras.....	122
4.2.1.3 Extração do DNA.....	124
4.2.1.4 Análises genéticas.....	125
4.2.1.5 Correlação espacial dos genótipos.....	126
4.2.1.6 Análises de paternidade.....	127
4.2.2 Resultados.....	129
4.2.2.1 Estrutura genética espacial.....	129
4.2.2.2 Análises de paternidade.....	130
4.2.3 Discussão.....	135
4.3 Conclusões.....	139
Referências.....	139
Anexo.....	145

RESUMO

ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis*) VISANDO O MANEJO E A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE

A andiroba (*Carapa guianensis*) é uma espécie arbórea de importância econômica na região Amazônica pelo grande interesse que vem despertando nas indústrias madeireira e cosmética. É uma planta monóica, com floração assincrônica e auto-incompatível. Ela é bastante plástica e se adapta para ocupar diferentes ambientes, sendo encontrada tanto no baixio como na terra firme. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a estrutura genética de duas populações naturais de andiroba e quantificar a diversidade genética intrapopulacional, a autocorrelação espacial e o fluxo gênico analisando uma única população em dois ambientes distintos (terra firme e baixio) e em três classes de tamanho (plântulas, jovens e adultos). Para o estudo interpopulacional, foram avaliados 39 indivíduos adultos no município de Porto Acre e 38 em Rio Branco. Já para o intrapopulacional analisaram-se 957 indivíduos do município de Rio Branco. Foram utilizados sete locos polimórficos de microssatélites que permitiram observar 42 alelos em ambas as populações, sendo que as estimativas dos parâmetros genéticos foram muito próximas entre elas. Não foi observada endogamia e a taxa de cruzamento aparente foi alta indicando reprodução por alogamia. A maior parte da variabilidade genética (90,5%) foi encontrada dentro das populações. No entanto, a divergência genética entre as populações (9,5%) foi estatisticamente significativa e pode ser considerada intermediária. Com relação à variabilidade intrapopulacional, observou-se 85 alelos na população Rio Branco, com 67 alelos ocorrendo no ambiente de terra firme e 70 no baixio. A diversidade gênica foi semelhante nas três classes de tamanho na população total e nos dois ambientes, não tendo sido observada endogamia em nenhuma das classes de tamanho dos ambientes. Também não foi observada divergência genética entre as classes de tamanho. Já entre os indivíduos do ambiente de terra firme e os do baixio esta divergência foi baixa (1,63%), mas significativa. A taxa de cruzamento aparente foi alta tanto para os ambientes como para a população total. As análises de autocorrelação espacial dos genótipos revelaram que a população Rio Branco apresentou baixa estruturação espacial, sendo que as árvores localizadas a uma distância de até aproximadamente 370 metros tenderam a ser geneticamente similares. No ambiente de baixio encontrou-se este mesmo padrão, com árvores localizadas a uma distância de até 160 metros mostrando-se mais aparentadas entre si. Quando se observou separadamente cada classe de tamanho neste ambiente, verificou-se baixa estruturação na classe dos jovens, e uma disposição quase que aleatória dos genótipos na classe dos adultos. Na terra firme não se observou estruturação espacial dos genótipos em nenhuma das classes. As análises de parentesco das plântulas indicaram que 7,3% dos parentais paternos foram encontrados no ambiente de terra firme e 9,4% no baixio. Este baixo índice encontrado mostra que é grande a quantidade de fluxo gênico vindo de fora da área amostrada. Verificou-se fluxo gênico de longo alcance dentro da população,

observando-se uma distância média de até 888,8 metros entre os ambientes. Com base nos conhecimentos gerados sobre a estrutura genética, podem-se estabelecer estratégias de manejo e conservação dessas populações naturais de andiroba.

Palavras-chave: Andiroba; *Carapa guianensis*; Diversidade gênica; Estrutura genética; Fluxo gênico; Marcadores microssatélites

ABSTRACT

GENETIC STRUCTURE AND GENE FLOW IN NATURAL POPULATIONS OF CRABWOOD (*Carapa guianensis*) AIMING AT THE SPECIES FOR MANAGEMENT AND CONSERVATION

Crabwood (*Carapa guianensis*) is a tree of economic importance in the Amazon region, due to the great interest it has been attracting in the wood and cosmetics industries. It is a monoecious species, with asynchronic flowering and self-incompatible. This species is very plastic and adapts to occupy different habitats, and it is found in the lowland and upland habitats. The objectives of this study were to evaluate the genetic structure between two natural populations of crabwood, and to quantify the intrapopulation genetic diversity, the spatial autocorrelation and gene flow of one population, considering two habitats (upland and lowland) and three size classes (seedlings, young plants and adults). For the interpopulation study, 39 adult individuals were evaluated in the municipal district of Porto Acre and 38 in Rio Branco. For the intrapopulation studies, 957 individuals were analyzed in the municipal district of Rio Branco. Seven polymorphic microsatellite loci were used to detect 42 alleles in both populations, where the genetic parameter estimates were very similar to each other. Inbreeding was not observed and the apparent outcrossing rate was high, indicating an outcrossing breeding system for this species. Most of the genetic variability (90.5%) was found to be within populations. However, the genetic divergence between them (9.5%) was statistically significant and can be considered as intermediate. Regarding the intrapopulation variability, 85 alleles were observed in the Rio Branco population, with 67 alleles occurring in the upland habitat and 70 in the lowland. The genetic diversity was similar in the three size classes in the total population, and in the two habitats. No inbreeding was observed in any of the size classes of either habitat. No genetic divergence was observed between size classes as well. Between individuals of the upland habitat and those of the lowland habitat, this divergence was low (1.63%), but significant. The autocorrelation spatial analysis of the genotypes showed that the Rio Branco population presented low spatial genetic structuring, with the trees located at a distance of approximately 370 meters tending to be genetically similar. In the lowland habitat the same pattern was found, with trees located at a distance of 160 meters tending to be more related between themselves. When each size class of this habitat was observed separately, a low spatial genetic structuring was found in the young classes and an almost random disposal of the genotypes was observed in the adult classes. In the upland habitat, a spatial genetic structure of the genotypes was not observed in any of the size classes. The paternity analysis of the seedlings indicated that 7.3% of the male parents were found in the upland habitat and 9.4% in the lowland. This low index shows that the amount of gene flow coming from outside the sampling area is high. Long-distance gene flow within the population studied was observed, with an average distance of 888.8 m found between habitats. Based in the acquired knowledge on the genetic structure, management and conservation strategies can be established for these natural crabwood populations.

Keywords: Crabwood; *Carapa guianensis*; Genetic diversity; Population structure; Gene flow; microsatellite markers

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma mega biodiversidade, tanto da flora quanto da fauna. Estima-se que mais de 20% das espécies do planeta são nativas de nosso território (NASS, 2001). Na região Amazônica encontra-se grande variedade de ambientes e, por conseqüência, um enorme potencial de recursos naturais. O uso sustentável destes recursos é um dos principais desafios para as próximas gerações. A falta de conhecimentos sobre a biologia, características silviculturais, agronômicas, fitoquímicas e genéticas da grande maioria das espécies da flora amazônica é motivo de preocupação, em decorrência do risco de erosão genética ou mesmo da perda destes recursos naturais, face à expansão da fronteira agrícola e à exploração irracional nesta região.

Cresce a cada dia o interesse dos países desenvolvidos pela biodiversidade da floresta Amazônica, visando a obtenção de substâncias fitoquímicas a serem utilizadas como matéria prima na fabricação de vários produtos, tais como: analgésicos, tranqüilizantes, laxantes, diuréticos, antibióticos, dentre outros. Este fato gera um aumento na demanda por fitoterápicos, o que tem levado à exploração desordenada dos recursos vegetais e provocado um acelerado processo extrativo de várias espécies nas áreas de ocorrência natural.

Segundo Mendonça-Hagler (2001), ações antrópicas sobre os ambientes naturais, principalmente qualquer atividade humana não sustentável, pode afetar a abundância relativa das espécies e, dessa forma, levá-las à extinção. A perda da biodiversidade causa a erosão genética, ou seja, a perda de variabilidade existente dentro de uma determinada espécie (CANÇADO; BORÉM, 2001). A utilização de produtos florestais, tanto para o setor madeireiro como para o não-madeireiro de forma irracional, pode levar à destruição de ambientes naturais e, como conseqüência, levar as espécies vegetais e animais à extinção.

A andiroba (*Carapa guianensis* Aublet.) apresenta-se como uma espécie arbórea de importância econômica na região Amazônica, pelo grande interesse que vem despertando nas indústrias madeireira e cosmética. Existem poucos estudos no que diz respeito a aspectos ecológicos e genéticos da andiroba, o que torna, portanto,

necessário aumentar o conhecimento sobre esta espécie e, dessa forma, contribuir para o entendimento da sua função dentro do ecossistema amazônico.

Estudos genéticos e ecológicos de uma espécie são essenciais para que sejam direcionadas práticas de manejo que visem a conservação e a utilização dos recursos genéticos de forma sustentável. Segundo Kageyama (1987), estes estudos envolvem o sistema reprodutivo, o fluxo gênico intra e interpopulacional, a distribuição espacial dos indivíduos e, principalmente, a variação genética entre e dentro das populações. O uso da genética de populações para quantificar a diversidade de populações arbóreas tropicais, vem apontando algumas direções importantes para se tomar como referência para ações visando minimizar os impactos ambientais nestes ambientes.

Objetivos

Considerando-se a escassez de informações sobre as conseqüências genéticas da exploração de populações naturais, a andiroba, espécie arbórea nativa da floresta Amazônica, foi estudada no que diz respeito à sua ecologia e genética, com os seguintes objetivos:

- a) Determinar o padrão de distribuição populacional em diferentes classes de tamanhos (jovens e adultos), considerando dois ambientes: terra firme e baixio;
- b) Avaliar a estrutura e a diversidade genética de populações de andiroba utilizando marcadores SSR;
- c) Estudar o sistema reprodutivo;
- d) Estimar o fluxo gênico entre populações e entre os ambientes de terra firme e baixio;
- e) Avaliar a distribuição espacial dos genótipos e verificar a ocorrência de estruturação na população Rio Branco;
- f) Verificar o parentesco médio entre os indivíduos dentro da população Rio Branco;
- g) Estimar o tamanho efetivo populacional, verificando a possível ocorrência de deriva genética.

Estes parâmetros de estudo são importantes, pois dessa forma se entenderá um pouco mais sobre o modo de reprodução desta espécie, de que forma a variabilidade genética encontra-se distribuída nestas populações, o que está diretamente relacionado ao fluxo gênico, sendo estes dados interessantes a serem considerados quando se definem estratégias de manejo com o objetivo de se utilizar adequadamente os recursos genéticos desta espécie, tanto para o setor madeireiro como para o não-madeireiro.

Hipóteses

Com base nas informações prévias a respeito da biologia da espécie, algumas hipóteses puderam ser formuladas:

- a) Encontram-se mais indivíduos jovens do que adultos na população Rio Branco.
- b) A andiroba apresenta sistema reprodutivo por alogamia.
- c) A maior parte da variabilidade genética encontra-se distribuída dentro de populações.
- d) A variabilidade genética encontra-se estruturada no espaço.
- e) Ocorre variação genética entre populações de terra firme e baixo, em uma mesma localidade.
- f) Ocorre fluxo gênico entre os ambientes de terra firme e de baixo.
- j) As populações encontram-se em equilíbrio de Mutação e Deriva, ou seja, não apresentam deriva genética.

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 A Floresta Amazônica

A Floresta Amazônica localiza-se ao norte da América do Sul, possuindo cerca de 6,5 milhões de km². Destes, cerca de 85% encontra-se em território brasileiro e os 15% restantes entre a Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. A chamada Amazônia Legal ocupa cerca de 5 milhões de km² do território brasileiro, aproximadamente 61% da área do nosso país (SIVAM, 2007).

O clima é equatorial quente e úmido, com temperatura variando pouco durante todo o ano. A distribuição das chuvas é bastante irregular, sendo em média de 2300 mm anuais (FISCH et al., 1998). A bacia do rio Amazonas possui aproximadamente 20% da disponibilidade mundial de água doce.

A Amazônia possui uma heterogeneidade de habitats, solos e micro climas que a caracterizam como um imenso ambiente formado por mosaicos de micro ambientes distintos e interdependentes. E estes diversos ambientes provavelmente são os responsáveis por esta floresta conter a maior biodiversidade do planeta (RIBEIRO et al., 1999). Existem três tipos de ambientes principais na Amazônia, relacionados com o relevo e definidos pelo volume de água dos rios, em função das chuvas. No ambiente de Igapó, as áreas são permanentemente inundadas, com vegetação adaptada a permanecer com suas raízes sempre debaixo d'água. No ambiente de Baixo, que fica localizado em áreas que são inundadas periodicamente apenas na época das cheias dos rios, encontram-se solos arenosos, que possuem acúmulo de sedimentos. Já o ambiente de Terra Firme, localizado em áreas mais altas que nunca se alagam, possui solo argiloso bem drenado e pobre em nutrientes (RIBEIRO et al., 1999), sendo que este ambiente é encontrado na maior parte da floresta.

A Floresta Amazônica exerce influência na manutenção climática da América do Sul e ainda tem grande influência no clima global, e sua interação com a atmosfera é de suma importância para a regulação de chuvas e do ciclo hidrológico em toda a América do Sul (ARTAXO, 2006).

As espécies nativas desta floresta são ainda pouco conhecidas. Aproximadamente 20 espécies são mundialmente reconhecidas e utilizadas no setor madeireiro e poucas são conhecidas como frutíferas ou por suas propriedades medicinais. Segundo Mittermeier et al. (1992), a Amazônia brasileira possui cerca de 40 mil espécies de plantas vasculares (sendo 30 mil endêmicas), 1300 espécies de aves, 425 mil espécies de mamíferos, 371 espécies de répteis e 427 de anfíbios.

1.1.2 Características da andiroba (*Carapa guianensis*)

Pertencente à família Meliaceae, a andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) distribui-se desde a América Central até o norte da América do Sul (Venezuela, Equador,

Colômbia, Peru e Brasil) (FERRAZ; SAMPAIO, 1996). No Brasil, ela ocorre em toda a Bacia Amazônica, principalmente em regiões próximas aos leitos dos rios mas são encontradas também em locais bem drenados de terra firme (JANKOWSKY et al. 1990; LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979). Registra-se a maior ocorrência nos Estados do Pará, Amapá, Amazonas e Maranhão (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA, 1998).

É uma espécie arbórea de sub-dossel ou dossel (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002), podendo chegar a 30 m de altura, possuindo tronco reto e cilíndrico e, geralmente, raízes tabulares. Possui casca cinzenta, grossa e amarga, apresentando descamação em placas (RIZZINI, 1971), com copa ramosa e de tamanho médio. Seus ramos tendem freqüentemente à posição vertical, com folhas imparipenadas, grandes e com numerosos folíolos opostos que apresentam um tom verde-escuro, forma oval-oblonga, acuminados e glabros (CORRÊA, 1974).

É uma planta monóica, com floração assincrônica e prolongada, sendo polinizada por insetos de pouca mobilidade como microlepidópteros e meliponinas (MAUÉS, 2006), auto-incompatível (HALL; ORREL; BAWA, 1994; MAUÉS, 2006) e com elevada densidade populacional nas áreas de ocorrência. Suas flores são pequenas, solitárias, axilares, subsésseis, glabras e de coloração amarelo-avermelhada a creme (LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979), raramente com pedicelos curtos e grossos, 4-meras predominantemente com 8 anteras, 1 ovário, 4-loculares e (2-)3-4(-6) óvulos por lóculo, folíolos mais elípticos, com um ápice acuminado (VIEIRA, 1991).

O fruto é uma cápsula globosa deiscente que, ao cair no chão, libera suas sementes (4 a 16 por fruto), as quais logo perdem a viabilidade, sendo denominadas recalcitrantes (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002), pois não suportam o dessecamento. No seu interior existe uma massa esbranquiçada que, quando seca, apresenta coloração branco-amarelada e que exuda óleo facilmente.

A andiroba é uma espécie bastante plástica e se adapta para ocupar diferentes nichos. Segundo Matta (1996, apud LEITE, 1997), ela é distinguida morfológicamente pela coloração do seu lenho, em função do habitat. Pennington et al. (1981), também citam esta distinção, mencionando que existem dois tipos de lenho reconhecidos pelos nativos: o vermelho e o branco. O vermelho é considerado superior ao branco e é

encontrado nas árvores que habitam as terras altas. O lenho branco é típico dos indivíduos de áreas alagadas. Outra diferença relacionada ao habitat está na coloração e na espessura do óleo obtido de suas sementes: nas áreas de baixio, o óleo é mais espesso e mais claro sendo que o óleo obtido de sementes de indivíduos de terra firme é mais ralo e escuro (LEITE, 1997).

Estudando a ecologia da *C. guianensis*, Leite (1997) observou que nas diversas regiões da Amazônia, esta espécie apresenta padrões de floração e frutificação variáveis. A frutificação na Amazônia Ocidental ocorre de outubro a dezembro, na Amazônia Central de dezembro a março, no Baixo Amazonas de março a junho e na Amazônia Oriental de junho a setembro. Observa-se, portanto, que na Amazônia brasileira encontram-se sementes de andiroba o ano todo. Uma árvore pode produzir de 180 a 200 kg de sementes por ano (LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979).

É uma espécie comum na floresta e sua densidade é bastante variável dentro do mesmo tipo de vegetação. No Pará, na floresta de baixio da Zona da Mata, são encontradas 1,6 árvores por hectare com DAP (diâmetro à altura do peito) acima de 25 centímetros e em floresta de transição, entre terra firme e baixio, foram encontradas 4 árvores por hectare (Instituto do Desenvolvimento Econômico-Social do Pará - IDESP, 1975). No Estado do Acre existem poucos dados sobre a ocorrência desta espécie. O projeto Radar na Amazônia - RADAM Brasil (BRASIL, 1976) cita a presença de seis árvores por hectare em floresta aberta, e 1,48 árvores em floresta densa. De acordo com Klimas (2006), a densidade populacional de *C. guianensis* é maior em ambiente de baixio em comparação à terra firme. A autora encontrou 25,5 e 14,5 indivíduos com DAP acima de 10 cm, respectivamente, em ambiente de baixio e terra firme.

Sua madeira possui propriedades físicas e mecânicas similares ao cedro (*Cedrela fissilis*), a cerejeira (*Torresea acreana*) e ao mogno (*Swietenia marophylla*) (ARAÚJO, 2002), não sofrendo o ataque de cupins, sendo empregada na fabricação de móveis, na construção civil e na indústria naval.

O óleo retirado de suas sementes tem coloração amarelo-clara e é extremamente amargo, sendo que em temperaturas inferiores a 25^oC se solidifica (LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979). Contêm substâncias como o ácido oléico, o palmítico e o esteárico, que lhes conferem propriedades anti-sépticas, anti-inflamatórias,

cicatrizantes e inseticidas (DUKE, 2004; LESLEI, 2005; LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979). É muito utilizado pelas populações ribeirinhas e nas indústrias de fitoterápicos e cosmética. Dados da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (1998), estimam que o Brasil consome cerca de 30 mil litros de óleo por ano, e a exportação anual é de 450 mil litros, em média.

É uma espécie clímax, apresentando bom desenvolvimento à sombra em seus estágios iniciais. Suas sementes não possuem dormência, germinam logo após a dispersão e possuem curta longevidade. A regeneração ocorre após a queda das sementes em locais e condições propícias para o seu estabelecimento. Seu crescimento é relativamente rápido em áreas degradadas ajudando na sua recuperação, fato que a torna uma espécie com potencial para plantios comerciais.

Schmidt e Volpato (1972), em estudos na Reserva Florestal Ducke (Manaus), onde realizaram medidas anuais, verificaram que a andiroba foi uma das espécies de melhor desenvolvimento e que aos seis anos de idade já apresentou frutificação. Segundo dados do MMA (1998), na Estação Experimental de Curuá-Una no Pará, em plantios experimentais, ela apresentou um aumento médio de 1,8 metros/ano na altura e 1,10 centímetros/ano no diâmetro, sendo apontada como espécie promissora para o reflorestamento de capoeiras.

Na Amazônia a exploração de muitas espécies de plantas de importância econômica, inclusive a andiroba, de forma predatória, pode levar ao desmatamento nas áreas de ocorrência natural. Tentar explorar estes recursos de forma sustentável é buscar conciliar o desenvolvimento econômico com a preservação ambiental. A humanidade de hoje deve se desenvolver em harmonia com as limitações ecológicas do planeta, ou seja, de forma sustentável, sem destruir o ambiente para que as gerações futuras tenham chance de existir e viver, de acordo com as suas necessidades.

1.1.3 Diversidade genética

O termo diversidade genética é normalmente utilizado para descrever variações herdáveis encontradas dentro de entidades biológicas e pode ser mensurada em indivíduos, populações e espécies. Em um loco particular, a diversidade pode estar

presente dentro de indivíduos, ou seja, encontram-se indivíduos com locos homozigotos e heterozigotos. Ela pode estar presente dentro da população, sendo observada quando os alelos presentes em um loco variável são encontrados em indivíduos diferentes. Se existir mais de dois alelos e o organismo for diplóide, nenhum dos indivíduos poderá exibir a variação total presente dentro do loco. Adicionalmente, a diversidade pode estar presente dentro das espécies, o que se verifica observando a variação nas freqüências alélicas entre populações (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005).

De acordo com Hamrick (1983), o estudo da diversidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis que a variação genética é mantida dentro das populações, bem como a forma que ela é dividida entre as populações.

A diversidade genética intrapopulacional pode ser caracterizada pelos índices: porcentagem de locos polimórficos (\hat{P}), número médio de alelos por loco (\hat{A}), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg; heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e índice de fixação (\hat{f}) (BERG; HAMRICK, 1997)

Loveless e Hamrick (1987) comentam que em espécies tipicamente alógamas ocorre maior variação genética dentro das populações e menor entre elas, sendo que a divergência entre populações será menor quanto maior for o fluxo gênico. Já em populações que se reproduzem por autofecundação, onde se tem limitada dispersão de pólen e sementes, ocorre baixa variação dentro das populações e alta entre elas.

Hamrick (1983) verificaram, em estudos com espécies arbóreas, que a distribuição dos alelos e genótipos não é aleatória dentro das populações, sendo determinada pela dispersão de pólen e sementes, ambiente de distribuição e seleção micro ambiental.

A estrutura genética é a distribuição não aleatória dos alelos e genótipos dentro das espécies (HAMRICK, 1983). Sua manutenção ocorre devido à interação entre fatores evolucionários, como seleção, deriva, migração e mutação, com fatores ecológicos como o sistema reprodutivo, distribuição espacial, tamanho efetivo, dispersão de pólen e sementes. A caracterização da estrutura genética entre populações tem sido realizada por três metodologias: estatísticas F de Wright

(WRIGHT, 1965); análise da variância das freqüências gênicas (COCKERHAM, 1969) e análise da diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973). As três abordagens apresentam bases genéticas similares, procurando verificar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações.

As estatísticas F de Wright fornecem os níveis médios de fixação dos alelos para o total de populações, dentro das populações e a divergência genética entre as populações, com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência (WRIGHT, 1965; NEI, 1977). A análise da variância fornece a distribuição genética da variabilidade em diversos níveis hierárquicos, considerando o erro associado à amostragem (COCKERHAM, 1969). Já, a diversidade genética de Nei fornece a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações e os níveis de heterozigidade esperados para o total e para a média das populações.

A diversidade genética promove matéria prima para a adaptação das espécies, sendo também a base para o melhoramento genético. Ela é a responsável por parte das diferenças de produtividade e reprodução entre os indivíduos de uma espécie (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005). Sua determinação em espécies arbóreas é de suma importância já que estas espécies são fundamentais na estrutura dos ecossistemas florestais. Espécies que apresentam valores baixos de diversidade genética podem ter reduzida sua capacidade de sobreviver a doenças e não se adaptarem a mudanças ambientais. Assim, a diversidade genética pode ser considerada de fundamental importância para a sustentabilidade e estabilidade dos ecossistemas (RAJORA, PLUHAR, 2003).

1.1.4 Manejo e conservação em espécies arbóreas

A conservação das populações naturais e, conseqüentemente, da sua diversidade genética, somente será possível quando esta estiver acoplada com alternativas que possibilitem renda às populações residentes na floresta e aos proprietários de terra. O manejo sustentável de populações naturais só será viável quando se conhecerem os processos biológicos responsáveis pela sustentabilidade biológica das espécies. Segundo Ticktin (2004), a retirada de produtos não-madeireiros pode afetar diversos processos biológicos em níveis individuais, em populações,

comunidades e ambientes. Dentro dos produtos não-madeireiros encontram-se flores, frutos, sementes, cascas, látex, resinas e outras partes da planta que não a madeira.

O crescimento no uso comercial destes produtos tem conduzido ao aumento na exploração destes recursos e contribuído para gerar aumento na renda de populações que vivem ao redor das florestas (ARNOLD; PÉREZ, 2001). Portanto, a coleta sustentável destes recursos não é somente essencial para a preservação das espécies naturais, mas também para o sustento de muitas comunidades ribeirinhas (TICKTIN, 2004).

O desmatamento, a fragmentação florestal e a extração de madeira podem ter sérias conseqüências em longo prazo na manutenção da diversidade genética de populações naturais. O corte seletivo pode reduzir a densidade das árvores e, em conseqüência, alterar o padrão de cruzamentos e aumentar a probabilidade de endogamia (JENNINGS et al., 2001). Embora a fragmentação e distúrbios com a retirada de madeira sejam comuns em florestas tropicais, existe pouco entendimento sobre o efeito destes processos no fluxo gênico e na diversidade genética das espécies (HAMRICK; MURAWSKI; NASON, 1993).

O desenvolvimento e aplicação de critérios e indicadores no âmbito de planos de manejo florestal são fundamentais para garantir a conservação e a manutenção da variabilidade genética das espécies exploradas. Para se tentar minimizar os danos causados pela retirada de espécies florestais, devem ser realizados estudos básicos de genética e ecologia (NAMKOONG et al., 1996).

Dentro deste contexto, algumas organizações tais como CIFOR (Centro para Pesquisa Florestal Internacional) e FSC (Conselho de Manejo Florestal), procuram padronizar práticas para se manter a sustentabilidade do manejo nas Florestas Tropicais. Estas têm indicado parâmetros ecológicos e genéticos que devem ser realizados para a conservação e o manejo sustentável das espécies (NAMKOONG et al. 1996).

Dentre os parâmetros ecológicos tem-se:

- estudos do padrão de distribuição geográfica (tipos e variedades de habitats);
- estudos sobre a biologia da reprodução;
- estudos sobre a regeneração;

- estudos sobre a sucessão florestal (a constante troca de espécies em um ambiente que sofreu um distúrbio natural ou não).

Dentre os parâmetros genéticos tem-se:

- índices para quantificar a variabilidade genética entre e dentro das populações;
- estimativas do tamanho efetivo populacional (N_e);
- estudos sobre o sistema reprodutivo;
- estudos sobre os mecanismos de fluxo gênico.

Embora estes parâmetros já existam há algum tempo, eles não têm sido levados em consideração na maioria dos planos de manejo. Neste contexto, estudos que tenham como objetivos identificar os impactos ecológicos e genéticos que a exploração madeireira e não-madeireira promovem, são de grande importância para o entendimento dos fatores responsáveis pelas diferenças em produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos de uma espécie, além de verificar se esta exploração promove perda na variabilidade genética (SEBBENN et al., 2000).

O estudo da variabilidade genética em espécies florestais ganhou maior ênfase com o uso de marcadores moleculares, que possibilitaram a observação da variação das espécies no nível do DNA. Estes podem ser utilizados tanto no estudo da variação intra como interespecífica, em pesquisas evolutivas e taxonômicas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), no estudo da estrutura genética de populações de espécies arbóreas (TELLES, 2000; VASCONCELOS, 2002; ZUCCHI, 2002; ZUCCHI et al., 2003). Eles têm sido utilizados também no monitoramento e na avaliação das consequências genéticas da exploração florestal em várias espécies (CONTE, 2003; CLOUTIER et al., 2007; DAYANANDAN et al., 1999; HALL; WALKER; BAWA, 1996; LEMES et al., 2003; SEBBENN et al., 2000; SOUZA, 2002).

Na Costa Rica, Dayanandan et al. (1999), estudaram populações de *C. guianensis* utilizando microssatélites, e verificaram que as estimativas de heterozigosidade observada em geral são superiores à diversidade gênica, mostrando que não há indícios de ocorrência de endogamia naquelas populações. Os autores observaram ainda que ocorrem níveis baixos de variação genética entre as populações estudadas. Em um estudo realizado na Amazônia brasileira, Lemes et al. (2003) verificaram a ocorrência de altos níveis de variação genética entre populações de

mogno (*Swietenia macrophylla*, Meliaceae), fato que indica diminuição no fluxo gênico entre as populações.

Zucchi (2002), estudando 10 populações de *Eugenia dysenterica* DC, espécie arbórea do cerrado brasileiro, utilizando marcadores moleculares RAPD e microssatélites, verificou que o fluxo gênico estimado entre as populações foi pequeno e restrito devido ao isolamento destas pela distância, além da ocorrência de deriva genética, provavelmente ocasionada pela grande antropização deste bioma.

O desmatamento das florestas tropicais tem aumentado em todo o mundo, trazendo, como conseqüência, a ameaça à manutenção da biodiversidade e de processos biológicos nestes ambientes. A diminuição na biodiversidade promove a perda da diversidade genética, observando-se com isso a redução no tamanho das populações, fato que interrompe o mutualismo existente entre animais polinizadores e dispersores de sementes (LEMES et al., 2003).

Cloutier et al. (2007), em estudos sobre os efeitos do corte seletivo realizado em uma população de *C. guianensis* na Floresta Nacional do Tapajós (PA), verificaram os mesmos níveis de diversidade gênica e riqueza alélica em árvores adultas e progênie antes e depois do corte seletivo. Eles concluíram que, em curto prazo, o corte seletivo desta espécie não está prejudicando sua variabilidade genética.

Para estimar e mitigar os efeitos genéticos do desmatamento e do manejo florestal, torna-se necessário obter informações da distribuição da variação genética, além de parâmetros ecológicos, como densidade, em populações arbóreas. Dentro deste contexto, verifica-se que o entendimento da estrutura genética populacional, de padrões de fluxo gênico e do sistema reprodutivo são pré-requisitos básicos para que possam ser criadas estratégias de conservação e manejo em populações naturais.

1.1.5 Estrutura genética espacial

A estrutura genética espacial ou autocorrelação espacial refere-se à distribuição espacial dos genótipos dos indivíduos dentro da população, sendo característica para cada espécie. Ela é determinada pelos padrões de dispersão de pólen e sementes, densidade de indivíduos adultos, seleção micro ambiental, regeneração e pelo sistema de reprodução (HAMRICK, LOVELESS, 1986; LOISELLE et al., 1995).

A existência da estrutura espacial, ou seja, a presença de indivíduos geneticamente correlacionados localizados próximos entre si, dentro da população, decorre principalmente das limitações físicas desta população que impedem a ocorrência de cruzamentos aleatórios entre os indivíduos, havendo, desta forma, maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos mais próximos, o que gera redução de heterozigotos e a formação de grupos, estruturando a população (FUTUYMA, 1992).

Escudero, Iriondo e Torres (2003) fizeram uma revisão sobre o uso de análise espacial em estudos de diversidade genética como uma ferramenta para a conservação de espécies de plantas, verificando que para uma efetiva conservação destas espécies, bem como para formular estratégias de manejo, torna-se necessário ocorrer integração entre os conhecimentos genéticos, demográficos e ecológicos. Alvarez-Buylla et al. (1996) comentam sobre a urgência no desenvolvimento de um modelo que integre fatores genéticos e demográficos para permitir a avaliação da importância das espécies arbóreas em florestas tropicais.

Considera-se que uma variável apresenta estrutura espacial (ou autocorrelação espacial) quando os valores da variável de interesse observados em pares de locais distanciados entre si, são mais similares (autocorrelação positiva) ou menos similares (autocorrelação negativa) do que o esperado para pares de observações associados ao acaso (LEGENDRE, 1993).

A caracterização da estrutura genética espacial pode ser realizada por várias técnicas, sendo que a mais utilizada é o índice I de Moran (ESCUDEIRO; IRIONDO; TORRES, 2003; LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005), que quantifica a similaridade genética entre pares de indivíduos espacialmente adjacentes. Este assume valores que podem variar de +1 (autocorrelação positiva) a -1 (autocorrelação negativa) (DEWEY; HEYWOOD, 1988).

Outro coeficiente utilizado para estudo da estrutura genética espacial é o coeficiente de parentesco ou de coancestralidade (θ_{xy}) (ERIKSON; HAMRICK, 2003; LOISELLE et al., 1995) que se baseia na probabilidade de se amostrarem aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência.

Assim, em um modelo de isolamento por distância em que se espera que os indivíduos espacialmente mais próximos sejam mais correlacionados do que os mais

distantes, pode-se esperar que a estimativa da coancestralidade diminua gradualmente entre os pares de indivíduos espacialmente mais próximos para os de maiores distâncias geográficas (LOISELLE et al., 1995).

A importância do conhecimento da estrutura genética espacial está relacionada com o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais, tanto para a conservação genética como para fins de melhoramento, possibilitando a formação de amostras mais significativas, e também para mitigar os efeitos de práticas de manejo (GANDARA, 1996). Em estudos populacionais, ela pode ser utilizada tanto para estimar o grau de isolamento de populações (GONZALES; HAMRICK, 2005), como em abordagens intrapopulacionais auxiliando na detecção de indivíduos aparentados (DOLIGEZ; JOLY, 1997), permitindo inferir sobre o alcance do fluxo gênico e o tamanho do grupo de vizinhança.

1.1.6 Fluxo gênico em populações naturais

A dispersão do pólen e de sementes entre as populações é conhecida como fluxo gênico. Este mecanismo reduz a diferenciação genética entre as populações e pode promover o aumento da variabilidade genética em populações receptoras (WRIGHT, 1931). O fluxo gênico, segundo Slatkin (1981, 1985), é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam na movimentação de alelos entre as populações. O seu papel na diversidade genética entre e dentro das populações depende tanto da distribuição geográfica da espécie, quanto da importância dos fatores evolucionários (SLATKIN, 1987).

Quando um indivíduo migra de uma população para outra, ele carrega genes que são representativos de sua população ancestral para a população recipiente. Caso ele tenha sucesso em seu estabelecimento e realize cruzamentos, ele irá transmitir esses genes entre as populações, sendo que essa transferência é chamada de fluxo gênico. Quando o pólen atinge a população ele já é incorporado por ela, enquanto que a semente tem que se transformar em plântula e se desenvolver para ser incorporada. O fluxo gênico é o fator evolutivo responsável pela homogeneização das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção (RIDLEY, 2006).

Segundo Hamrick e Loveless (1986), diferentes padrões na dispersão das sementes têm efeitos nos níveis de variação genética dentro das populações e na distribuição da variação genética entre as populações. Os mecanismos de dispersão de sementes são classificados em:

- 1) Autocoria ou barocoria (dispersão pela gravidade): ocorre a deposição das sementes próximas à árvore mãe e com isso tem-se um aumento na estrutura das populações e da homoziguidade, reduzindo o tamanho efetivo (N_e) e promovendo a diversidade genética entre as populações;
- 2) Anemocoria (dispersão pelo vento): a concentração das sementes vai diminuindo com o aumento da distância, onde seu movimento depende da velocidade dos ventos e das características morfológicas da semente. Este tipo de dispersão inibe a diferenciação local, mesmo com a migração sendo limitada.
- 3) Zoocoria (dispersão por animais): envolve a digestão ou o transporte das sementes. Pode ser realizada a longas distâncias, e neste caso a estrutura genética entre as populações será reduzida promovendo homogeneidade. Quando é realizada dentro de uma mesma população, ou seja, a uma distância mais ou menos curta, pode reduzir o agrupamento dos indivíduos e a estrutura das populações.
- 4) Hidrocoria (dispersão pela água): ocorre em plantas de locais alagados ou próximos de cursos de água ou do mar que possuem características especiais de adaptação que permitem a sua sobrevivência, e uma delas é a capacidade das sementes flutuarem (BARRAT-SEGRETAIN, 1996; MORTON; HAGG, 1989). As sementes são dispersas a longas distâncias, já que são carregadas pelas águas dos rios e com isso ocorre redução na diversidade genética entre as populações.

Segundo Hamrick e Loveless (1989), populações de espécies que apresentam polinização realizada por animais que percorrem longas distâncias apresentam maior diversidade genética que aquelas polinizadas pelo vento ou por animais que percorrem curtas distâncias, onde o fluxo gênico é limitado. Já a dispersão das sementes pelo vento ou por animais apresenta maior diversidade genética dentro das populações do que a dispersão por barocoria.

De acordo com Futuyama (1992), o grau de diferenciação entre as populações depende do nível de fluxo gênico entre elas. Existem diferentes modelos de fluxo gênico que correspondem a diferenças na estrutura da população, dentre os quais incluem:

- Modelo Continente-Ilha, no qual existe um modelo unidirecional de uma população grande (continental) para uma menor e isolada.
- Modelo Ilha, no qual a migração ocorre ao acaso em grupos de pequenas populações.
- Modelo Alpondras (stepping-stone), no qual a migração ocorre ao acaso em grupos de pequenas populações vizinhas.
- Modelo do Isolamento pela distância, no qual o fluxo gênico ocorre localmente entre os vizinhos, em uma população.

Segundo Sork et al. (1999), tem sido crescente os estudos do fluxo gênico pelo modelo de metapopulação e o de paisagem. A estimação da dinâmica temporal e espacial da movimentação de pólen e sementes com as respectivas características atuais da paisagem, pode ajudar na predição de respostas genéticas e demográficas de determinada espécie.

Existem dois modos de se estudar os padrões de fluxo gênico em populações naturais: os métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos envolvem corantes, marcadores morfológicos e análise de paternidade, os quais possuem a limitação de só poderem ser aplicados em populações pequenas. Ainda hoje há relativamente poucas medidas diretas do fluxo gênico em populações de plantas (ZUCCHI, 2002).

A análise de paternidade é uma excelente ferramenta para a definição do fluxo de pólen e, conseqüentemente, o fluxo gênico nas populações. É um método no qual usualmente se emprega genótipos multilocos para inferir os pais de progênies de sementes de mães conhecidas, fornecendo a descrição da estrutura individual com detalhes (ZUCCHI, 2002). Esta análise usa um loco genético para identificar o mais provável pai de um conjunto de pais candidatos (HAMRICK; SCHNABEL, 1985) e após a identificação deste, pode-se ter uma idéia do padrão de movimento do pólen na população.

Os primeiros estudos de análise de paternidade eram baseados na estimativa de exclusão. Entretanto, este método pode identificar erroneamente o candidato a pai verdadeiro por apresentar alguns problemas causados por erros de genotipagem ou

mutações (MARSHALL et al., 1998). A estatística Delta (Δ), definida por Marshall et al. (1998), auxilia na determinação da paternidade e é baseada no método da máxima probabilidade que tolera erros de genotipagem e define o indivíduo com mais chance de ser o pai com base nas frequências alélicas. A análise considera o número de candidatos a pai, a proporção de indivíduos amostrados e as falhas ou erros nos dados genéticos. Segundo os autores, o programa Cervus 2.0 é indicado para as análises de paternidade, utilizando-se de marcadores codominantes.

Os métodos indiretos são baseados na estrutura genética das populações (ZUCCHI, 2002), sendo eles via F_{ST} , alelos privativos e autocorrelação espacial. O uso do F_{ST} vem sendo rotineiramente empregado para estimar o número de migrantes por geração (Nm) para um conjunto de populações ou de subpopulações. Este é chamado também de fluxo gênico aparente.

O uso de alelos privativos para avaliação do fluxo gênico foi descrito inicialmente por Slatkin (1985), e é baseado na frequência média de alelos que são exclusivos de uma ou poucas populações (alelos raros). A frequência destes alelos é utilizada para estimar a média do número de migrantes permutados entre as populações.

Mais recentemente, pesquisas mais precisas têm sido realizadas utilizando os marcadores organelares (cpDNA e mtDNA), que possuem predominantemente herança unilateral, e também análise de paternidade utilizando os marcadores microssatélites associados com estudos ecológicos. Vários autores têm utilizado os marcadores microssatélites para estudos de parentesco em populações naturais de espécies arbóreas (CIAMPI, 1999; COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999) e todos concordam com o elevado poder de discriminação genética destes, o que permite determinar com extrema precisão a relação de parentesco entre adultos e regenerantes nestas populações.

1.1.7 Marcadores microssatélites (SSR) e sua utilização em *C. guianensis*

Existem vários tipos de marcadores moleculares, dentre os quais encontram-se os microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats) que fazem parte das seqüências de DNA repetitivo encontradas no genoma de eucariotos (CHARLESWORTH; SIEGOWSKI; STEPHAN, 1994). Este marcador é constituído de pequenas seqüências

repetidas em tandem, compostas de 1 a 6 pares de bases, encontradas no genoma de vertebrados, insetos e plantas (CHARLESWORTH; SHIIGOWSHI; STEPHAN, 1994). São encontrados tanto em regiões codificadoras como não codificadoras e são, freqüentemente, muito polimórficos devido ao alto nível de variação no número de repetições.

As diferentes repetições de SSR encontradas são divididas em: 1) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; 2) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; e 3) repetições compostas, quando duas ou mais repetições de SSR estão dispostas adjacentes. Estas repetições compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (CAIXETA et al., 2006).

As seqüências de DNA que flanqueiam os SSR são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores (“primers”) específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Os produtos da amplificação podem ser observados em gel de poliacrilamida ou de agarose de alta resolução. As bandas são visualizadas no gel por meio de coloração com brometo de etídio ou nitrato de prata. Recentemente, têm sido utilizados “primers” fluorescentes em combinação com seqüenciador semiautomático de DNA (CAIXETA et al., 2006)

Em plantas, sabe-se que os sítios de microssatélites estão amplamente distribuídos, com uma freqüência de um a cada 50 mil pares de bases. Sua presença foi comprovada em 34 espécies vegetais, sendo o di-nucleotídeo AT o elemento repetido mais comum (MORGANTE; OLIVERI, 1993).

Os SSR possuem todas as características desejáveis para serem utilizados em estudos de genética de populações, sendo os mais utilizados para estudos populacionais (CHASE; KESSELY; BAWA, 1996; POWELL; MACHRAY; PROVAN, 1996). Além das curtas repetições em tandem, as seqüências que flanqueiam os SSR (“primers”) são conservadas. Eles são codominantes, o que permite a diferenciação entre os genótipos homozigóticos e heterozigóticos nos indivíduos analisados (FERREIRA; GRATTAPAGLA, 1998; GRATTAPLAGIA, 2001). Apresenta segregação mendeliana simples e sua expressão não é influenciada pelo ambiente. Além dessas características, os microssatélites são abundantes na maioria dos genomas, são

hipervariáveis, possuem grande conteúdo informativo, são baseados em PCR, necessitando de reduzidas quantidades de DNA para sua amplificação. Todo loco de microssatélite é definido por um par de “primers”, sendo que a genotipagem pode ser semi-automatizada em ensaios multiplex, o que permite a análise de vários locos ao mesmo tempo, sendo transferíveis entre populações e espécies do mesmo gênero (CHASE; KESSELY; BAWA, 1996; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; GRATTAPAGLIA, 2001; SOUZA, 2002).

A principal limitação deste marcador refere-se ao custo de desenvolvimento dos primers, porém esta é facilmente compensada pela ampla potencialidade de pesquisas desenvolvidas após a sua obtenção (GRATTAPAGLIA, 2001).

Várias espécies da família Meliaceae têm sido estudadas com o uso dos microssatélites (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999; CLOUTIER et al., 2007; DAYANANDAN et al., 1999; LEMES et al., 2003). O uso destes marcadores tem sido uma ferramenta efetiva para o entendimento da estrutura genética, do fluxo gênico, do grau de parentesco, além de quantificar os efeitos da fragmentação florestal e guiar estratégias de conservação.

O primeiro trabalho analisando a diversidade genética em *C. guianensis* foi realizado no final da década de 90 por Dayanandan et al. (1999) que desenvolveram marcadores microssatélites para avaliar a estrutura populacional em áreas onde ocorre manejo florestal desta espécie. Foram estudados indivíduos jovens e adultos de duas áreas onde ocorre o manejo florestal e de uma área preservada. Os autores verificaram que não ocorre endogamia nas populações, mas que o desmatamento e a fragmentação do habitat estavam provocando fluxo gênico restrito entre as populações.

Kageyama et al. (2004) foram pioneiros no estudo desta espécie no Brasil, utilizando os SSR para avaliar a estrutura genética de duas populações divididas por classe de tamanho no Estado do Acre. Eles verificaram estimativas bem parecidas entre as populações do número médio de alelos por loco (\hat{A}); número efetivo de alelos por loco (\hat{A}_e) e diversidade gênica sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e).

Vinson et al. (2005) desenvolveram marcadores microssatélites para *C. guianensis*, para dar suporte aos estudos genéticos do projeto Dendrogene (Conservação Genética em Florestas Manejadas na Amazônia), que teve como objetivo

principal desenvolver mecanismos para usar o conhecimento científico, para promover o manejo florestal sustentável e a conservação das espécies. Cloutier et al. (2005) utilizaram microssatélites cloroplastidiais para o estudo do efeito da dispersão hidrocória de sementes de andiroba na Amazônia brasileira, concluindo que a hidrocoria não promove fluxo gênico em grande escala, não sendo a principal responsável pelo padrão de distribuição filogeográfica da espécie.

O uso dos SSR tem sido uma ferramenta importante para verificar a estrutura das populações antes e depois do manejo florestal, onde ocorre o corte seletivo das árvores de maior diâmetro e com isso pode-se ter uma redução do fluxo gênico e aumento de endogamia. Cloutier et al. (2007) verificaram que o manejo florestal em uma área da Floresta Nacional Tapajós, no Pará, não promoveu alterações na diversidade genética na população de *C. guianensis* que foi avaliada antes e após o corte seletivo.

Referências

ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; GARCÍA-BARRIOS, E.; LARA-MORENO, C.; MARTÍNEZ-RAMOS, M. Demographic and genetics models in conservation biology: Applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 386-421, Mar. 1996.

ARAÚJO, H.J. de. **Agrupamento das espécies madeireiras ocorrentes em pequenas áreas sob manejo florestal do projeto de colonização Pedro Peixoto (AC) por similaridade das propriedades físicas e mecânicas**. 2002. 168p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARNOLD, J.E.M.; PÉREZ, M.R. Can non-timber forest products match forest conservation and development objectives? **Ecological Economics**, Amsterdam, n. 39, v. 3, p. 437-447, Dec. 2001.

ARTAXO, P. A Amazônia e as mudanças globais. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.38, n. 224, p.20-25, mar. 2006.

BARRAT-SEGRETAIN, M.H. Strategies of reproduction, dispersion, and competition in river plants: A review. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 123, n. 1, p. 13-37, Mar. 1996.

BERG, E. E.; HAMRICK, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional da Produção Mineral. Projeto RADAMBRASIL – **Levantamento de recursos naturais: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra**. folha SC19. Rio de Janeiro. 1976, 420 p. 12 v.

CAIXETA, T.E.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYANA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, T.E. (Eds.) **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. cap. 1, p. 9-78.

CANÇADO, G.M.A.; BORÉM, A. Biodiversidade, agropecuária e sustentabilidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 213, p. 39-45, dez. 2001.

CHARLESWORTH, B.; SIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamic of repetitive DNA in eucaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, Sept. 1994.

CHASE, M.; KESSELY, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 83, n. 1, p. 51-57, Jan. 1996.

CIAMPI, A.Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e Sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera Langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado**. 1999. 204p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1999.

CLOUTIER, D.; PÓVOA, J.S.R.; PROCOPIO, L.C.; LEÃO, N.V.M.; WADT, L.H.O.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 54, n. 6, p. 270-274, Dec. 2005.

CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 797-809, Feb. 2007.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lawrence, v.23, n.1, p.72-74, Mar.1969.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, Oxford, v. 83, n. 6, p. 748-756, Dec. 1999.

CONTE, R.; NODARI, R.O.; VENCovsky, R.; REIS, M.S. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, London, v. 91, n. 4, p. 401-406, Oct. 2003.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Mistério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1974.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELE, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 1585-1592, Oct. 1999.

DEWEY, S.E.; HEYWOOD, J.S.. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. Distribution of genotypes. **Evolution**, Lawrence, v. 42, n. 4, p. 834-838, July 1988.

DOLIGEZ, A.; JOLY, H.I. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. **Heredity**, London, v. 79, n. 1, p. 72-82, July 1997.

DUKE, J. Phytochemical and ethnobotanical databases. (USDA/ARS). **Chemicals and their biological activities in: *Carapa guianensis* AUBL. (Meliaceae) – Andiroba**. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl>>. Acesso em: 26 nov. 2004.

ERICKSON, D. L.; HAMRICK, J.L. Genetic and clonal diversity for *Myrica cerifera* along a spatiotemporal island chronosequence. **Heredity**, London, v. 90, n. 1, p. 25-32, Jan. 2003.

ESCUADERO, A; IRIONDO, J M; TORRES, E. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. **Biological Conservation**, Beijing, v. 113, n. 3, p. 351-365, Oct. 2003

FERRAZ, I.D.K., SAMPAIO, P.T.B. Métodos simples de armazenamento das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D.C. – Meliaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 26, n. 3, p. 137-144, jul. set. 1996.

FERRAZ, I.D.K., CAMARGO, J.L.C., SAMPAIO, P.T.B. Sementes e plântulas de andiroba (*C. guianensis* AUBL. e *C. procera* D.C.): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**, Manaus, v 32, n. 4, p. 661-647, out. dez. 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cernargem, 1998. 220p.

FISCH, G.; MARENGO, J.A.; NOBRE, C.A. Uma revisão geral sobre o clima da Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 28, n. 2, p. 101-126, abr. jul. 1998.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: SBG, 1992. 631p.

GANDARA, F.B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Campinas, Campinas, 1996.

GONZALES, E.; HAMRICK, J.L. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum*. **Heredity**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 306-314, Dec. 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: Eucaliptus como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds.) **Recursos Genéticos & Melhoramento: Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap. 30, p. 967-994.

HALL, P.; ORREL, L.C.; BAWA, K. Genetic diversity and mating system in a tropical tree. *Carapa guianensis* (Meliaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 9, p. 1104-1111, Sept. 1994.

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree. *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, Gainesville, v. 10, n. 3, p. 757-768, June 1996.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, et al. (Eds.). **Genetics and Wild Population Management**. New York: Addison-Wesley, 1983. chap. 4, p. 500-508.

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**. Dordrecht: Junk Publishers, 1986. chap. 17, p. 211-223.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: Associations with reproductive biology. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y.B. (Eds.) **Plant Evolutionary Ecology**. Boulder: Westview Press, 1989. chap. 2, p. 131-146.

HAMRICK, J. L.; SCHNABEL, A. Understanding the genetic structure of plant populations: Some old problems and a new approach. In: GREGORIOUS, H.R. (Ed.). **Population Genetics in Forestry**. Berlin:Springer-Verlag, 1985. chap. 1, p. 50-70.

HAMRICK, J.L., MURAWSKI, D.A.; NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Plant Ecology**, v. 107/108, n. 1, p. 281-297, June 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário Estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, 1996/98.

INSTITUTO DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO-SOCIAL DO PARÁ. **Matérias primas celulósicas do estuário do Rio Amazonas**. Relatório técnico, Belém: IDESP, 1975. 251p

JANKOWSKY, I.P.; CHIMELO, J.P.; CAVALCANTE, A.A.; GALINA, I.C.M.; NAGAMURA, J.C.S. **Madeiras brasileiras**. Caxias do Sul: Spectrum, 1990.v. 1, 172p.

JENNINGS, S.B.; BROWN, N.D.; BOSHIER, D.H.; WHITMORE, T.C.; LOPES, J.C.A. Ecology provides a pragmatic solution to maintenance of genetic diversity in sustainably managed tropical rain forest. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 154, n. 1-2, p. 1-10, Nov. 2001.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação in situ de recursos genéticos de plantas. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 35, p. 3-37, abr. 1987.

KAGEYAMA, P.Y.; CARON, D.; GANDARA, F.B.; MARTINS, K.; WADT, L.H.O.; LACERDA, C.M.B.; BOUFLEUER, N.T.; RIBAS, L.A.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E.M. Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western Amazonian settlements. In: VINCETI, B.; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Orgs.). **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: IPGRI, 2004, p. 149-217.

KLIMAS, C. A. **Ecological review and demographic study of *Carapa guianensis***. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade da Florida, Florida-EUA, 2006.

LEGENDRE, P. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? **Ecology**, Washington, v. 74, n. 6, p. 1659-1673, Sept. 1993.

LEITE, A. M. C. **Ecologia de *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) “Andiroba”**. 1997. 180p. Tese (Doutorado em Botânica). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, 1997.

LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 2875-2883, Nov. 2003.

LESLIE, T. **The healing power of Rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinals**. New York: Square one Publishers, 2005. 535p.

LOISELLE, B.A.; SORK VL, NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, Nov. 1995.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J.L. Distribution de la variation gentic a en especies arbreas tropicales. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 35, n. 1, p.165-176, Mar. 1987.

LOUREIRO, A.A.; SILVA, M.F.; ALENCAR, J.C. **Essências madeireiras da Amazônia**. Manaus: INPA/SUFRAMA. 1979. v. 2, 245p.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics**: design, analysis, and application. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 326p

MARSHALL, T.C.; SLATE J.; KERUUK L.E.B.; PEMBERTON, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 639-655, May 1998.

MAUÉS, M.M. **Estratégias reprodutivas de espécies arbóreas e sua importância para o manejo e conservação florestal: Floresta Nacional de Tapajós (Belterra-PA)**. 206p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MENDONÇA–HAGLER, L.C.S. Biodiversidade e biossegurança. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 18, p. 16- 22, jan. fev. 2001.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Produtos potenciais da Amazônia: Andiroba**. Brasília: MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA. 1998. v.19, 36p.

MITTERMEIR, R. A.; WERNER, T.; AIRES, J. M.; FONSECA, G. A. B. O país da megadiversidade. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.14, n. 81, p. 20-27, maio 1992.

MORGANTE. M.; OLIVERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1. p. 175-182, Jan. 1993.

MORTON, J.K.; HOGG, E.H. Biogeography of island floras in the Great Lakes. II. Plant dispersal. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, n. 12, p. 1803-1820, Dec. 1989.

NAMKOONG, G.; BOYLE, T.J.B.; GREGORIUS, H.-R.; JOLY, H.; SAVOLAINEN, O.; RATNAM, W.; YOUNG, A. **Testing Criteria and Indicators for assessing the sustainability of forest management: genetic criteria and indicators.** Sindangbarang: CIFOR; Working Paper 10. 12p. 1996. Disponível em: <<http://www.cifor.cgiar.org/Publications>>. Acesso em: 10 jun. 2005.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap.2, p. 29-56.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of American**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, Dec. 1973.

NEI, M. F-Statistic and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annual Human Genetics**, New York, v. 41, n. 10, p. 225-33, Oct. 1977.

PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. D.; TAYLOR, D. A.H. Meliaceae. In: New York Botanical Garden (Org.). **Flora Neotropica.** New York, 1981. Monograph 28, p. 235-244.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequences repeat. **Trends in Plants Science**, Oxford, v. 1, n. 7, p. 215-222, July 1996.

RAJORA, O.P.; PLUHAR, S.A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n.7, p. 1203-1212, May 2003.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. 1999. **Flora da Reserva Ducke. Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-firmena Amazônia Central**, Manaus: INPA, 1999. 816p.

RIDLEY, M. **Evolução.** 3. ed. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2006. 752p.

RIZZINI, T.C. **Plantas do Brasil: árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia brasileira.** São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1971. 294p.

SAMPAIO, P.T. Andiroba. In: CLEMENTE, C. R., CLAY, I. W., SAMPAIO, P. T. **Biodiversidade amazônica**. Manaus: SEBRAE/AM. 1998. 48p.

SCHMIDT, P.B.; VOLPATO, E. 1972. Aspectos silviculturais de algumas espécies nativas da Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 2, n. 2, p. 99-122, abr. jun. 1972.

SEBBEN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 58, p.127-143, dez. 2000.

SIVAM - SISTEMA DE VIGILÂNCIA DA AMAZÔNIA. **Amazônia Legal**. Disponível em: <<http://www.sivam.gov.br/AMAZONIA/apres1.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

SLATKIN, M. Estimating level of gene flow in natural populations. **Genetics**, Baltimore, v. 99, n. 2, p. 323-335, Feb. 1981.

SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, Lawrence, v. 39, n. 1, p. 53-65, Dec. 1985.

SLATKIN M. 1985. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **American Association for the Advancement of Science**, Philadelphia, v. 236, n. 4803, p. 787-792, May 1987.

SORK, V.L.; NASON, J.; CAMPBELL, D.R.; FERNANDEZ, J.F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 14, n. 6, p. 219-224, June 1999.

SOUZA, P. C. A. **Aspectos ecológicos de uma população natural de *Euterpe oleracea* Mart. no estuário amazônico**. 2002. 60p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TELLES, M.P.C. **Diversidade genética e estrutura populacional de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) do Sudeste de Goiás**. Goiânia, 2000. 128p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

TICKTIN, T. The ecological implications of harvesting non-timber forest products. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 41, n.1, p. 11-21, Feb. 2004.

VASCONCELOS, G.M.P. **Diversidade genética de *Myrciaria floribunda* (West e Willdenow) Berg (Cambuí) em paisagem fragmentada da Serra da Mantiqueira, MG.** 2002. 84p. Dissertação (Mestrado em Recursos florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

VIEIRA, L.S. **Manual da medicina popular a fitoterapia da Amazônia.** Belém: FCAP, serviços de documentação e informação, 1991. 248p.

VINSON, C.C.; AZEVEDO, V.C.R.; SAMPAIO, I; CIAMPI, A.Y. Development of microsattelite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 33-34, Mar. 2005.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelin population. **Genetics**, Baltimore, v. 16, n. 2, p. 97-159, Feb. 1931.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistic with spatial regard to systems of mating. **Evolution**, Lawrence, v.19, n. 3, p. 395-420, Sept. 1965.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 148p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.V.; PINHEIRO, J.B.; LÁZEROO, J.C.; COELHO, A.S.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysentrica* DC in the brazilian Cerrado utilizing SSR markes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v, 26, n. 4, p. 449-457, Dec. 2003.

2 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* AUBL., MELIACEAE)

RESUMO

Este estudo teve como objetivos avaliar a estrutura e a diversidade genética, bem como a ocorrência de deriva genética, de duas populações de andiroba (*Carapa guianensis*) localizadas em área de Floresta Tropical Úmida no Estado do Acre, Brasil. Foram avaliados 39 indivíduos adultos no município de Porto Acre e 38 em Rio Branco, utilizando sete locos de microsatélites. Um total de 56 alelos foram observados nas duas populações. O número médio de alelos por loco foi $\hat{A} = 8,0$ e o número efetivo médio de alelos por loco foi $\hat{A}_e = 3,2$. Embora as frequências alélicas tenham oscilado entre as duas populações, observou-se que na maioria dos locos os alelos mais freqüentes eram os mesmos para ambas. A diversidade gênica ($\hat{H}_e = 0,609$) representou 70% da máxima diversidade possível. Na população Rio Branco foram encontrados desvios significativos a 5% para a presença de alelos nulos nos locos Cg 17 e Cg 05p. Em cada população foram observados 42 alelos, as estimativas de \hat{A} , \hat{A}_e , \hat{H}_e e \hat{H}_o foram elevadas e semelhantes entre elas. Os valores estimados de \hat{f} não diferiram de zero indicando que não ocorre endogamia nas populações. A taxa de cruzamento aparente foi alta para ambas as populações o que indica que esta espécie se reproduz por alogamia. A distribuição da variabilidade genética revelou que 90,5% desta variabilidade encontra-se dentro das populações. A divergência genética entre as duas populações foi estatisticamente significativa e pode ser considerada intermediária. Não foram detectados indícios da ocorrência de deriva genética.

Palavras-chave: Andiroba; Árvore tropical; *Carapa guianensis*; Diversidade gênica; Estrutura genética; Marcadores microsatélites

**GENETIC STRUCTURE IN NATURAL POPULATION OF CRABWOOD
(*Carapa guianensis* Aubl., MELIACEAE)**

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the structure and genetic diversity, as well as the occurrence of genetic drift, of two crabwood (*Carapa guianensis*) populations located in an area of Tropical Rainforest in the State of Acre, Brazil. Using seven microsatellite loci, 39 adult individuals were evaluated in the municipal district of Porto Acre and 38 in Rio Branco. Fifty six alleles were found in the two populations. The number of alleles per locus was $\hat{A} = 8.0$, and the effective number of alleles per locus was $\hat{A}_e = 3.20$. Although the allelic frequencies varied between the two populations, that for most loci the most frequent alleles were observed to be the same for both populations. The gene diversity (\hat{H}_e) represented 70% of the maximum possible diversity. In the Rio Branco population, significant deviations were found at 5% for the presence of null alleles in loci Cg 17 and Cg 05p. In both populations, 42 alleles were observed, and the estimates for \hat{A} , \hat{A}_e , \hat{H}_e and \hat{H}_o were very similar. The estimated \hat{f} values did not differ from zero, indicating that inbreeding does not occur in the populations. The apparent outcrossing rate was high for both population, which indicates that this species reproduces by outcrossing. The distribution of the genetic variability revealed that 90.5% of this variability occurs within population. The genetic divergence between the two populations was statistically significant and can be considered intermediate. No signs of genetic drift were detected.

Keywords: Crabwood; Tropical trees; *Carapa guianensis*; Genetic diversity; Population structure; Microsatellite markers

2.1 Introdução

O Brasil é detentor de mais de 20% da biodiversidade de todo o planeta (NASS, 2001). Na região Amazônica encontra-se grande variedade de ambientes e, por conseqüência, um enorme potencial de recursos naturais. O uso sustentável destes recursos é um dos principais desafios para nossa sociedade.

A conservação das populações naturais e, conseqüentemente, da sua diversidade genética, somente será possível quando esta estiver acoplada com alternativas que possibilitem renda às populações residentes na floresta e aos proprietários de terra. A extração de produtos madeireiros e não madeireiros pode afetar a manutenção da diversidade genética de populações naturais. Neste contexto, o uso da genética de populações para quantificar a diversidade de populações naturais, vem apontando algumas direções importantes para se tomar como referência para ações de minimização dos impactos nestes ambientes.

A andiroba (*Carapa guianensis*) é uma espécie arbórea clímax de crescimento rápido, pertencente à família das meliáceas. Distribui-se desde a América Central até o norte da América do Sul (FERRAZ; SAMPAIO, 1996; LEITE, 1997). No Brasil, ela ocorre em toda a bacia Amazônica, principalmente nas várzeas próximas aos leitos dos rios, mas é encontrada também em locais bem drenados de terra firme (JANKOWSKY et al., 1990; LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979). Quando adulta esta espécie pode atingir mais de 30 m de altura, sendo uma árvore decídua de dossel a subdossel (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002). É uma planta monóica, com floração assincrônica e prolongada, auto-incompatível (HALL; ORRELL; BAWA, 1994; MAUÉS, 2006), sendo polinizada por insetos de pouca mobilidade como microlepidópteros e meliponinas (MAUÉS, 2006), apresentando elevada densidade populacional nas áreas de ocorrência.

Apresenta-se como uma espécie arbórea de importância econômica na região Amazônica pelo grande interesse que vem despertando nas indústrias madeireira e cosmética. Sua madeira apresenta boa trabalhabilidade, sendo empregada na fabricação de móveis, na construção civil e na indústria naval (VIANNA, 1982). O óleo retirado de suas sementes, conhecido na região Amazônica como “azeite de andiroba”, contém propriedades anti-sépticas, antiinflamatórias, cicatrizantes e inseticidas (DUKE,

2004; LESLIE, 2005; LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979), sendo muito procurado pelas indústrias farmacêutica e cosmética.

Existem alguns estudos sobre aspectos genéticos desta espécie. O primeiro trabalho foi realizado por Hall; Orrel e Bawa (1994), que estudaram o sistema reprodutivo e a diversidade genética de *C. guianensis* em populações na Costa Rica utilizando marcadores isoenzimáticos. Dayanandan et al. (1999) e Kageyama et al. (2004), utilizaram marcadores microssatélites para avaliar a estrutura populacional desta espécie em áreas onde ocorre manejo florestal. Cloutier et al. (2005) utilizaram SSR cloroplastidiais para o estudo do efeito da dispersão hidrocória de sementes de andiroba na Amazônia brasileira. Ainda Cloutier et al. (2007) com o uso de SSR verificam a estrutura de uma população antes e depois do manejo florestal, na Floresta Nacional Tapajós, no Pará, onde ocorre o corte seletivo das árvores de maior diâmetro e com isso pode-se ter uma redução do fluxo gênico e aumento de endogamia. Os autores observaram que não ocorreram mudanças significativas nos níveis de diversidade gênica e de riqueza alélica em árvores adultas e progênies antes e depois do corte seletivo, concluindo que, em curto prazo, o manejo desta espécie não está prejudicando sua variabilidade genética.

É, portanto, necessário aumentar o conhecimento sobre esta espécie e, dessa forma, contribuir para o entendimento da sua função dentro do ecossistema amazônico.

No presente trabalho, utilizou-se de marcadores moleculares microssatélites para estudar duas populações de andiroba no Estado do Acre. Com o uso destes marcadores este estudo pretende responder às seguintes questões:

- a) qual a magnitude da diversidade genética das populações avaliadas?
- b) de que maneira a variabilidade genética encontra-se distribuída entre e dentro de populações?
- c) existe a ocorrência ou não de fenômenos como a deriva genética?
- d) o sistema reprodutivo desta espécie é por alogamia?
- e) qual a taxa de fluxo gênico aparente entre as populações?

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Área de estudo

O Estado do Acre é um dos nove estados brasileiros que compõem a chamada Amazônia Legal. Sua economia se baseia no agro-extrativismo, na pecuária e na indústria madeireira. Possui clima tropical quente úmido, com uma estação seca que ocorre entre os meses de junho a agosto com temperatura média anual de 24,5°C. A vegetação dominante nesta região é classificada como floresta tropical úmida, possui topografia ligeiramente ondulada tendo áreas mais altas (terra firme) e áreas ocasionalmente inundadas (baixio) e altitude variando entre 100 a 200 m acima do nível do mar (GOVERNO DO ESTADO DO ACRE, 2006).

Foram avaliadas duas populações de andiroba (*C. guianensis*). Uma população está localizada no Projeto de Assentamento Extrativista Caquetá (09° 37' 29" S e 67° 27' 25" W), no município de Porto Acre. Esta área é caracterizada pelo extrativismo da borracha (*Hevea brasiliensis*), e coleta de outros produtos florestais não madeireiros, tais como: castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) e sementes de andiroba. A outra população está situada na Reserva Florestal da Embrapa Acre (10° 01' 28" S e 67° 42' 19" W), no município de Rio Branco (Figura 1). A distância geográfica entre as duas regiões é de aproximadamente 71 km.

Amostras foliares de 39 indivíduos adultos reprodutivos da população do município de Porto Acre e 38 da população de Rio Branco foram enviadas para o Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em Brasília, onde foram realizadas as análises genéticas.

2.2.1.2 Extração do DNA e análise genética

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o procedimento de CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1987) adaptado por Machado et al. (2002) que utiliza a máquina Fastprep – BIO 101 SAVANT para a trituração do material vegetal ao invés de nitrogênio líquido.

Aproximadamente 30 mg de folhas secas foram colocadas em microtubos de 2 ml contendo uma conta de cerâmica grande e sobre as amostras foi colocada uma

conta de porcelana pequena. Adicionou-se 700 µl de tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2 M de EDTA, 1% de PVP, 0,1 M de Tris-HCl) previamente aquecido a 65°C, acrescido de 2% de β-mercaptoetanol. Os microtubos foram levados para a máquina Fastprep por 40 segundos, e em seguida colocados em banho-maria à temperatura de 65°C durante 60 minutos. Após este tempo foi acrescentado a cada microtubo 600 µl de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico), que é um solvente orgânico, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. Com este procedimento, obteve-se a separação das fases aquosa e orgânica.

Foram retirados aproximadamente 500 µl do sobrenadante (fase aquosa) e transferidos para microtubos de 1,5 ml. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 400 µl de isopropanol a -20°C. Os microtubos foram mantidos a -20°C por cerca de 30 minutos e, em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos, para formação do precipitado de DNA (“pellet”). O isopropanol foi descartado, e o “pellet” foi lavado duas vezes com adição de 500 µl de etanol 70%, com agitação vigorosa e centrifugação. Foi feita uma terceira lavagem com adição de 500 µl de etanol absoluto. Este foi retirado gentilmente e os “pellets” ficaram secando à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, foram acrescentados 30 a 50 µl de solução TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA) com RNase (0,5 mg) aos microtubos com a finalidade de ressuspender o DNA do “pellet”.

Depois de extraído, o DNA genômico foi quantificado por meio da análise comparativa de cada amostra com o DNA fago λ de peso conhecido (20 a 200 ng) em eletroforese em géis de agarose 1% (0,3 g de agarose; 30 ml TBE 1X - 93 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA; 4,5 µl de brometo de etídio (1 mg/ml)). A concentração das amostras foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência de suas bandas com as do DNA padrão. Posteriormente, o DNA foi diluído em água MilliQ a 1ng/µl.

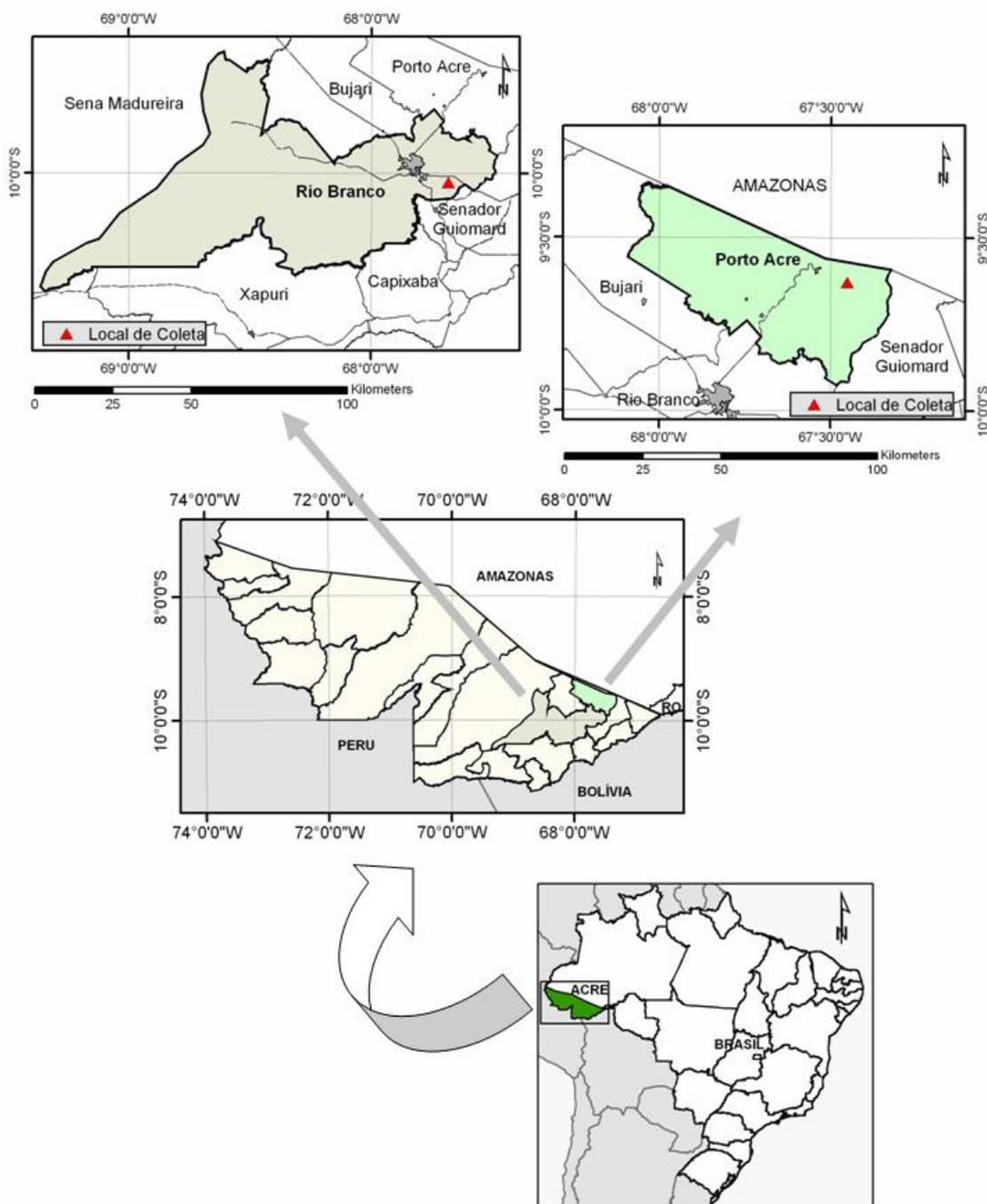


Figura 1 - Mapa de localização do Estado do Acre, dos municípios de Rio Branco e Porto Acre e dos locais de coleta (em vermelho) dentro de cada um destes municípios

Foram utilizados sete pares de iniciadores específicos para *Carapa guianensis*, todos polimórficos, cinco desenvolvidos por Vinson et al. (2005) (Cg 01, Cg 06, Cg 12, Cg 16 e Cg 17) e dois por Dayanandan et al. (1999) (Cg 05, Cg 07, chamados aqui de Cg 05p e Cg 07p, respectivamente). As seqüências “forward” e “reverse” de cada loco microssatélite estão apresentadas na Tabela 1. O iniciador “forward” de cada loco foi marcado com um fluorocromo específico (HEX, 6-FAM e NED).

Tabela 1 - Seqüência dos pares de iniciadores polimórficos que amplificaram locos microssatélites (SSR) em *Carapa guianensis*, com as respectivas amplitudes alélicas em pares de base, temperatura de hibridação (T_a) e número total de alelos por loco (\hat{A})

Locos	Fluorocromo	Seqüência do iniciador (5' – 3')	Amplitude Alélica (pb)	T_a (°C)	\hat{A}
Cg 01	NED	F: CCT GGG A CG TAT T TC TGC TG R: GCA GCA GCA CCT CTC TCT TT	190-198	56	3
Cg 06	NED	F: ACC CTC GCC TCC TTT GTT R: TGA GTC GAC ATG TGT CAG CA	140-162	56	6
Cg 12	6-FAM	F: TGA AAA GAC CAA TGC ATG AGA R: CAT TGC GGG TAC ACA GTT T	149-165	52	7
Cg 16	6-FAM	F: CGC TAT TGA GCG TGT GAG AC R: GTG GGA GCA GAT CTG AAA GC	159-187	56	11
Cg 17	6-FAM	F: ATT TAG GCC ATT GCA GGC TA R: ACG TTT GGT ATC GGA ACT GC	201-221	52	8
Cg 05p	HEX	F: TGC ATT TCT TCT CCT TGC TTC TGG R: TCT TGT ACG TTG GCT CTT GCA CAT TC	170-190	56	11
Cg 07p	HEX	F: AAG ACT TCC CCC AGA TTT GTT TTT R: TGT ACC AGT TCA GTT GAT GCT CA	210-250	52	10

Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados um ou dois locos de SSR por reação. Utilizou-se o iniciador “forward” de cada loco marcado com um fluorocromo diferente, ou com o mesmo fluorocromo, porém com amplitudes alélicas distintas, por reação. As reações de PCR foram otimizadas para 6 μ l de volume final, contendo 1 ng de DNA genômico; 1X de tampão de reação da PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, pH 8,3, Phoneutria); 0,25 μ M de cada iniciador

("forward" marcado e "reverse"); 0,27 ng/ml de BSA (Albumina Sérica Bovina, Biolabs); 0,27 mM de dNTP e 0,125 U Taq polimerase (Phonetría) e água MilliQ autoclavada.

As amplificações foram realizadas utilizando os termocicladores 9600 e 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica para cada par de iniciadores por 1 minuto (Tabela 1), 72 °C por 1 minuto e terminando com uma etapa de alongamento a 72°C por 7 minutos.

O produto das reações foi diluído na proporção 1:3 (1 µl de reação para 3 µl de água MilliQ). Em seguida, 1 µl dessa diluição foi colocado em placa microtitulação de 96 poços, que continha 9 µl de formamida HiDi, 0,25 µl de marcador interno fluorescente (ROX) (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001) e 0,75 µl de água MilliQ. Após a desnaturação (95°C por 3 minutos), a placa foi levada para o seqüenciador ABI 3700 da Perkin Elmer, onde ocorreu a eletroforese e detecção dos fragmentos amplificados.

Os fragmentos de DNA de tamanhos diferentes foram separados através de um sistema de eletroforese capilar. A detecção e a estimativa do tamanho dos alelos em pares de base foram realizadas com o uso do programa GeneScan (APPLIED BIOSYSTEMS versão 3.7, 2001). Em seguida os valores foram importados para o programa Genotyper (APPLIED BIOSYSTEMS versão 2.0, 1996) para filtragem de picos, interpretação e compilação final dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo. Para cada loco as estimativas do tamanho dos alelos em pares de base foram determinadas como sendo par ou ímpar de acordo com o tamanho previsto no desenvolvimento do marcador. Alelos com tamanho estimado intermediário às classes esperadas foram definidos como alelos da classe mais próxima (inferior ou superior) com maior frequência.

2.2.1.3 Análise Estatística

2.2.1.3.1 Avaliação dos locos

Os sete locos foram avaliados com uso do programa Micro-checker que identifica erros de genotipagem, permitindo verificar a presença de alelos que não são amplificados (alelos nulos), a dominância de alelos curtos e a presença de "stutters" (bandas duplicadas) (OOSTERHOUT et al., 2004). Quando há alelos nulos nos locos,

os erros de genotipagem podem resultar em déficit no número observado de heterozigotos, causando desvios nas proporções de EHW.

O método utilizado para estimar a frequência de alelos nulos (r) em cada loco foi o Estimador 1 de Brookfield (1996):

$$r = \frac{(H_e - H_o)}{(1 + H_e)}$$

Em que:

r = frequência de alelos nulos

H_o = heterozigosidade observada, que é medida por $n2/(n1+n2)$, onde $n1$ é o número de uma banda individual e $n2$ é o número de duas bandas individuais na amostra.

H_e = heterozigosidade esperada, que é calculada como a soma dos produtos de todas as frequências observadas ($\sum p_i p_j$, com $i \neq j$).

2.2.1.3.2 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas e genotípicas de cada loco foram submetidas ao teste exato de Fisher para verificar a aderência às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, como descrito por Weir (1996), com a utilização do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002).

2.2.1.3.3 Desequilíbrio genotípico entre pares de locos

O teste de desequilíbrio genotípico entre pares de locos foi realizado com uso do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002), que utiliza a média composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (WEIR, 1979). Por esse procedimento, genótipos de dois locos são associados várias vezes. Para locos nucleares, espera-se que não ocorra associação entre os pares de locos.

2.2.1.3.4 Diversidade genética intrapopulacional

As freqüências alélicas foram estimadas para os indivíduos das duas populações por: $\hat{p}_{ij} = (n_{ij}/n_{.j})$, em que \hat{p}_{ij} = freqüência do alelo i na população j ; n_{ij} = número de ocorrências do alelo i na população j ; $n_{.j}$ = número total de alelos amostrados na população j ; com o uso do programa F_{STAT} (GOUDET, 1995).

A diversidade genética intrapopulacional foi estimada utilizando-se o programa estatístico GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002). Os parâmetros obtidos foram: número médio de alelos por loco (\hat{A}), diversidade gênica (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e índice de fixação (\hat{f}). A máxima diversidade possível (\hat{H}_{max}) em cada loco foi calculada a partir do número de alelos observados, em que: $H_{max} = (\hat{A} - 1) / \hat{A}$.

A estimacão de \hat{A} foi obtida pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos; o número efetivo de alelos por loco (\hat{A}_e) foi calculado a partir de $\hat{A}_e = 1 / (1 - \hat{H}_e)$; a diversidade gênica foi obtida a partir de $\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$, onde: p_i é a freqüência alélica estimada do i -ésimo alelo; a heterozigosidade observada (\hat{H}_o) para cada loco foi estimada por: $\hat{H}_o = 1 - \sum p_{ii}$ onde p_{ii} é a freqüência de genótipos homozigóticos. O índice de fixaco (\hat{f}) foi estimado de acordo com Weir (1996):

$$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e}$$

Para verificar se os valores médios de \hat{f} eram diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança a 99% de probabilidade pelo método de reamostragem "bootstrap", utilizando-se 10.000 reamostragens sobre os locos pelo programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002).

A taxa de cruzamento aparente foi estimada conforme o procedimento descrito por Weir (1996) e Vencovsky (1994) de acordo com a relação:

$$\hat{t}_a = \frac{(1 - \hat{f})}{(1 + \hat{f})}$$

Em que:

\hat{t}_a = taxa de cruzamento aparente;

\hat{f} = índice de fixação dentro da população.

2.2.1.3.5 Estrutura genética

A estrutura genética foi caracterizada pelas análises de variância das frequências alélicas (WEIR, 1996), sendo consideradas as populações Porto Acre e Rio Branco. Os parâmetros estudados foram: índice médio de fixação dentro das populações (\hat{f}), índice de fixação total das populações (\hat{F}) e divergência genética entre populações ($\hat{\theta}_p$).

Para verificar se as estimativas médias destes índices eram estatisticamente diferentes de zero, estimou-se um intervalo de confiança de 95% de probabilidade pelo método de reamostragem “bootstrap” utilizando 10.000 repetições por loco. As análises de variância e os “bootstraps” foram estimados pelo programa estatístico GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002). O parâmetro R_{ST} (SLATKIN, 1995) foi estimado com o auxílio do programa R_{ST} Calc (GOODMAN, 1997).

O tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e) foi estimado de acordo com Vencovsky e Crossa (2003):

$$\hat{N}_e = \frac{n}{(1 + \hat{f})}$$

Em que:

n = o tamanho amostral;

\hat{f} = é o índice de fixação dentro da população.

Foi verificada a representatividade genética (\hat{N}_e/N) das amostras.

O fluxo gênico aparente (Nm) entre as populações foi estimado pelo método indireto calculado de acordo com o modelo proposto por Wright (1951) segundo a fórmula:

$$Nm = \frac{1}{4} \left[\frac{1}{\hat{F}_{ST}} - 1 \right]$$

Em que:

m = taxa de migração;

N = tamanho populacional;

Nm = número de migrantes/geração.

O \hat{F}_{ST} foi substituído pelo $\hat{\theta}_p$, conforme sugerem Cockerham e Weir (1993), para uma estimativa não viesada do fluxo gênico.

2.2.1.3.6 Análise de deriva genética

Foi utilizado o programa Bottleneck 1.2.02 (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999) para verificar se as populações encontravam-se em equilíbrio entre mutação e deriva genética, conforme metodologia descrita por Cornuet e Luikart (1996). Estes testes baseiam-se no princípio de que as populações que experimentam uma recente redução no seu tamanho efetivo exibem redução correlacionada do número de alelos e da diversidade gênica esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) nos locos polimórficos. No entanto, o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a H_e , o que faz com que H_e se torne maior do que a heterozigosidade esperada sob Equilíbrio entre Mutação e Deriva (H_{eq}), porque H_{eq} é calculada a partir do número de alelos e do tamanho amostral (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY; LUIKART;

CORNUET, 1999). Por esse procedimento, o excesso de heterozigiosidade ($H_e > H_{eq}$) é testado e não o excesso de heterozigotos ($H_o > H_e$).

Para a realização das análises utilizaram-se os modelos de mutação aos passos (SMM) e de mutação de duas fases (TPM), sendo que este último é recomendado para locos de SSR (LUIKART et al., 1998).

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Diversidade genética

Com os sete locos de microssatélites utilizados foi possível observar 56 alelos em 77 indivíduos de duas populações (39 indivíduos da população Porto Acre e 38 da população Rio Branco). Os locos Cg 16 e Cg 17 (oito alelos cada) foram os mais polimórficos na população Porto Acre. Já na população Rio Branco os locos mais polimórficos foram Cg 16, Cg 05p e Cg 07p, com nove alelos cada (Tabela 2).

O número médio de alelos por loco foi $\hat{A} = 8,0$, enquanto o número efetivo médio de alelos foi 3,207 (Tabela 3), indicando que embora os locos sejam polimórficos, alguns deles apresentaram um número elevado de alelos com baixa frequência. Embora as frequências alélicas tenham oscilado entre as duas populações, observou-se que na maioria dos locos os alelos mais frequentes eram os mesmos para ambas as populações (Tabela 2).

A média da diversidade gênica observada com os sete locos de SSR possibilitou detectar 70% da máxima diversidade possível (85%) (Tabela 3). Os locos Cg 16 e Cg 05p, com 11 alelos, foram os que apresentaram diversidade gênica mais elevada, enquanto o loco Cg 01, com apenas três alelos, foi o que apresentou menor estimativa. Com relação à presença de alelos nulos, verificou-se que ocorreram desvios significativos a 5% para os locos Cg 17 e Cg 05p na população Rio Branco (Tabela 4).

Tabela 2 - Frequência de alelos por loco em *Carapa guianensis* nas populações de Porto Acre e Rio Branco

Locos	Porto Acre	Rio Branco	Locos	Porto Acre	Rio Branco
Cg 01			Cg17		
<i>n</i>	39	38	<i>n</i>	39	38
198	0,013	0,013	203	0,013	-
200	0,936	0,842	205	0,013	-
204	0,051	0,145	207	0,128	-
Cg 06			211	0,051	0,092
<i>n</i>	39	38	213	0,333	0,539
136	0,013	-	215	0,282	0,303
140	0,449	0,145	217	0,154	0,066
142	0,487	0,842	219	0,026	-
150	0,013	-	Cg 05p		
154	0,026	0,013	<i>n</i>	39	38
156	0,013	-	170	-	0,013
Cg 12			172	-	0,132
<i>n</i>	38	38	174	0,359	0,303
143	0,013	-	176	0,410	0,303
147	0,145	-	178	0,038	0,026
151	0,026	0,039	180	0,013	0,118
153	0,211	0,342	184	0,051	0,066
155	-	0,118	190	-	0,026
157	0,605	0,487	192	0,115	-
159	-	0,013	194	0,013	-
Cg 16			204	-	0,013
<i>n</i>	39	38	Cg 07p		
151	0,026	-	<i>n</i>	39	38
159	0,308	0,053	214	0,051	-
161	0,013	-	216	0,462	0,526
163	0,269	0,184	218	0,013	0,013
165	0,192	0,224	220	0,449	0,079
167	0,128	0,132	224	-	0,013
169	0,038	0,237	226	0,026	0,079
171	0,026	0,092	228	-	0,026
173	-	0,026	230	-	0,013
175	-	0,039	232	-	0,237
179	-	0,013	234	-	0,013

Tabela 3 - Estimativas de parâmetros genéticos obtidos para sete locos de SSR nas populações Porto Acre e Rio Branco de *Carapa guianensis*, em que N : número de indivíduos analisados; \hat{A} : número de alelos por loco; \hat{A}_e : número efetivo de alelos por loco \hat{H}_e : diversidade gênica sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \hat{H}_o : heterozigosidade observada; \hat{H}_{\max} : máxima diversidade para cada loco; \hat{H}_e/\hat{H}_{\max} : proporção da diversidade máxima

Locos	N	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_o	\hat{H}_e	\hat{H}_{\max}	\hat{H}_e/\hat{H}_{\max}
Cg 01	77	3	1,250	0,195	0,200	0,667	30%
Cg 06	77	6	1,905	0,39	0,475	0,833	57%
Cg12	76	7	2,625	0,789	0,619	0,857	72%
Cg 16	77	11	6,173	0,792	0,838	0,909	92%
Cg 17	77	8	3,425	0,675	0,708	0,875	81%
Cg 05p	77	11	4,016	0,636	0,751	0,909	83%
Cg07p	77	10	3,049	0,537	0,672	0,900	75%
Média	76,857	8	3,207	0,573	0,609	0,850	70%

O modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) possibilita verificar se as frequências genotípicas encontram-se nas proporções esperadas para cruzamentos aleatórios e que não estejam sofrendo efeitos de processos evolucionários. Desvios no EHW podem ser causados por estes fatores e também pelo sistema misto de reprodução. Através das probabilidades do Teste Exato de Fisher (Tabela 5) verificou-se que na população Porto Acre somente o loco Cg 12 não se encontrava nas proporções esperadas para EHW. Por outro lado, na população Rio Branco a maioria dos locos não estava em equilíbrio. A associação entre locos foi avaliada pelo teste do desequilíbrio genotípico entre pares de locos, utilizando-se as frequências genotípicas. Verificou-se associação significativa a 5% entre 14,28% dos locos em ambas as populações.

Tabela 4 – Frequência de alelos nulos pelo método de estimação de Brookfield (1996) para as populações Porto Acre e Rio Branco de *Carapa guianensis*

Locos	Porto Acre	Rio Branco
Cg 01	-0,006 ^{ns}	0,005 ^{ns}
Cg 06	0,047 ^{ns}	-0,015 ^{ns}
Cg 12	-0,142 ^{ns}	-0,093 ^{ns}
Cg 16	-0,025 ^{ns}	0,036 ^{ns}
Cg 17	-0,074 ^{ns}	0,098
Cg 05p	0,011 ^{ns}	0,098
Cg 07p	0,044 ^{ns}	-0,019 ^{ns}

^(ns) valores não significativos a 5% de probabilidade.

Tabela 5 – Probabilidades do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, para cada loco de SSR nas populações Porto Acre e Rio Branco de *Carapa guianensis*

Locos SSR	Porto Acre	Rio Branco
Cg 01	1,000 ^{ns}	1,000 ^{ns}
Cg 06	0,308 ^{ns}	0,148 ^{ns}
Cg12	0,017	0,000
Cg 16	0,324 ^{ns}	0,047
Cg 17	0,252 ^{ns}	0,004
Cg 05p	0,188 ^{ns}	0,015
Cg07p	0,816 ^{ns}	0,043

^(ns) valores não significativos a 5% de probabilidade.

Ambas as populações apresentaram altos índices de diversidade genética. Em ambas foram observados 42 alelos, tendo-se uma média de 6 alelos por loco, onde o número efetivo médio de alelos por loco também não variou (Tabela 6). Verifica-se que na população Porto Acre a estimativa de $\hat{H}_e = 0,587$ foi ligeiramente inferior que $\hat{H}_o = 0,615$, indicando um excesso de heterozigotos, o que é confirmado pelo valor de \hat{f} que foi pequeno e negativo. Já para a população Rio Branco a estimativa de $\hat{H}_e = 0,584$ foi ligeiramente superior que $\hat{H}_o = 0,549$, indicando um excesso de homozigotos, o que é

confirmado pelo valor de \hat{f} que foi pequeno e positivo. Mas observando-se os intervalos de confiança a 99%, verifica-se que estes valores não são significativos (Tabela 6). A taxa de cruzamento aparente, a qual foi calculada a partir da estimativa de \hat{f} , foi elevada para as populações, o que indica que esta espécie se reproduz predominantemente por alogamia.

O tamanho efetivo de uma população (\hat{N}_e) depende do número de indivíduos que efetivamente participam da reprodução e de sua contribuição relativa para a geração seguinte (VENCOVSKY; CROSSA, 2003). O \hat{N}_e indica a representatividade genética da amostra. Na Tabela 6 verifica-se que na população Porto Acre o valor estimado de \hat{N}_e foi maior que o número de indivíduos amostrados. Já na população Rio Branco este valor estimado foi menor.

As duas populações apresentaram alelos exclusivos (Tabela 7), sendo que a grande maioria deles é rara, visto que aparecem uma a duas vezes nas populações. Verifica-se também que na população Porto Acre foram encontrados três alelos exclusivos com freqüências superiores a 0,11. Já na população Rio Branco encontraram-se três alelos exclusivos com freqüências acima de 0,11, e um deles com freqüência de 0,2368.

2.2.2.2 Estrutura genética

Os resultados obtidos indicaram ausência de endogamia nas duas populações, já que o índice de fixação médio das populações ($\hat{f} = 0,006$) e para o conjunto de populações ($\hat{F} = 0,079$) não diferiu de zero (Tabela 8).

Os valores estimados de $\hat{\theta}_p$ e R_{ST} foram significativamente diferentes de zero. As diferenças observadas entre estas duas estimativas ocorrem devido ao modelo mutacional utilizado no cálculo das estimativas. Enquanto o $\hat{\theta}_p$ se baseia no modelo de alelos infinitos, o R_{ST} utiliza o modelo de mutação aos passos. A medida de divergência genética entre as populações utilizando o R_{ST} foi intermediária, demonstrando que

ocorre variação de 9,5% entre as duas populações avaliadas e que 90,5% da diversidade encontra-se dentro das populações (Tabela 8).

Tabela 6 – Estimativas de índices de diversidade genética obtidas para as populações Porto Acre e Rio Branco de *Carapa guianensis*, em que N : número médio de indivíduos analisados; A_T : número total de alelos por loco; \hat{A} : número médio de alelos por loco; \hat{A}_e : número efetivo médio de alelos por loco; \hat{H}_e : diversidade gênica sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \hat{H}_o : heterozigosidade média observada; \hat{f} : índice de fixação; ta taxa de cruzamento aparente; \hat{N}_e : tamanho efetivo populacional; \hat{N}_e/N : relação entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral

Parâmetros	Porto Acre	Rio Branco
N	38,8	38,0
A_T	42	42
\hat{A}	6 (0,578) ¹	6 (0,913) ¹
\hat{A}_e	2,42	2,40
\hat{H}_o	0,615 (0,084) ¹	0,549 (0,069) ¹
\hat{H}_e	0,587 (0,071) ¹	0,584 (0,072) ¹
\hat{f} (IC _{99%}) ²	- 0,047 (- 0,245 a 0,092) ²	0,061 (- 0,128 a 0,214) ²
ta	1,11	0,88
\hat{N}_e	40,77	35,81
\hat{N}_e/N	1,05	0,94

¹() erros-padrão;

²(IC) intervalo de confiança a 99% de probabilidade, usando 10.000 reamostragens “bootstraps” sobre os locos.

Tabela 7 – Frequência de alelos exclusivos por loco, nas populações de Porto Acre e Rio Branco

Locos	Alelos	Porto Acre	Rio Branco
Cg 06	136	0,0128	-
Cg 06	150	0,0128	-
Cg 06	156	0,0128	-
Cg 12	143	0,0131	-
Cg 12	147	0,1447	-
Cg 12	155	-	0,1184
Cg 12	159	-	0,0132
Cg 16	151	0,0256	-
Cg 16	161	0,0128	-
Cg 16	173	-	0,0263
Cg 16	175	-	0,0395
Cg 16	179	-	0,0131
Cg 17	203	0,0128	-
Cg 17	205	0,0128	-
Cg 17	207	0,1282	-
Cg 17	219	0,0256	-
Cg 05p	170	-	0,0132
Cg 05p	172	-	0,1316
Cg 05p	190	-	0,0263
Cg 05p	192	0,1154	-
Cg 05p	194	0,0128	-
Cg 05p	204	-	0,0132
Cg 07p	214	0,0513	-
Cg 07p	224	-	0,0132
Cg 07p	228	-	0,0263
Cg 07p	230	-	0,0132
Cg 07p	232	-	0,2368
Cg 07p	234	-	0,0132

O fluxo gênico aparente (Nm) estimado com base no valor de R_{ST} foi de 2,38. Essa medida refere-se ao fluxo gênico histórico ou passado, desse modo deve ser interpretada com cautela, pois indica que as populações de diferentes regiões apesar de geograficamente isoladas, apresentam alelos e frequências similares com resultado de trocas gênicas antigas.

Em uma população que sofreu deriva recentemente, a maioria dos locos exibirá um excesso de heterozigosidade (LUIKART; CORNUET, 1998), ou seja, a diversidade

gênica observada será maior que a diversidade gênica de equilíbrio. Para o presente estudo não foram detectados indícios de ocorrência de “bottleneck” nas populações (Tabela 9)

Tabela 8 – Estimativas das estatísticas F , usando medidas de Weir e Cockerham (1984) e de R_{ST} para alelos de *Carapa guianensis* nas populações Porto Acre e Rio Branco. Valores médios de índice de fixação de alelos dentro da população (\hat{f}), para o conjunto das populações (\hat{F}), divergência genética entre as populações ($\hat{\theta}_p$) e fluxo gênico aparente (Nm)

	\hat{f}	\hat{F}	$\hat{\theta}_p$	R_{ST}	Nm
Estimativa	0,006	0,079	0,073	0,095	2,38
Limite superior (IC 95%)	0,089	0,172	0,119	0,151	
Limite inferior (IC 95%)	-0,117	-0,051	0,036	0,066	

(IC) intervalo de confiança a 95% de probabilidade usando 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre os locos.

Tabela 9 – Teste de Wilcoxon para determinar se as populações de *Carapa guianensis* estão sofrendo efeito de gargalo genético, em que E/D: locos em excesso/déficit de heterozigidade; P : probabilidade de ocorrência de “bottleneck” para cada população; TPM: modelo de mutação em duas fases (Two-phase model) e SMM: modelo de mutação aos passos (Stepwise mutation model). Piracicaba – SP, 2007

Populações	TPM		SMM	
	E/D	P^1	E/D	P^1
Porto Acre	2/5	0,812	0/7	1,000
Rio Branco	4/3	0,656	2/5	0,988

¹Probabilidade do teste de Wilcoxon a 95%, teste unicaudal para excesso de heterozigidade.

2.2.3 Discussão

O estudo da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de andiroba é de suma importância para que se definam estratégias de manejo e conservação, visto que é crescente a importância desta espécie, pois além de ser alvo da indústria madeireira, suas sementes também são muito procuradas.

Os sete locos SSR utilizados foram eficientes para a detecção da variação genética em ambas as populações, confirmando o elevado conteúdo de informação genética deste marcador. A estimativa média de diversidade gênica ($\hat{H}_e = 0,609$) encontrada nas populações estudadas foi inferior a valores estimados de \hat{H}_e encontrados em outros estudos nesta mesma espécie (CLOUTIER et al., 2007; DAYANANDAN et al., 1999; KAGEYAMA et al., 2004) e em outras espécies arbóreas da Amazônia (HOLLINGSWORTH et al., 2005; LEMES et al., 2003; NOVICK et al., 2003; WHITE; POWELL, 1997).

A diversidade máxima (\hat{H}_{\max}) representa o valor máximo teoricamente esperado da diversidade gênica (\hat{H}_e) de acordo com o número observado de alelos. Considerando o modo como os parâmetros \hat{H}_e e \hat{H}_{\max} são calculados, constata-se que a ocorrência de muitos alelos raros em uma população ocasiona um aumento proporcionalmente maior na estimativa de \hat{H}_{\max} (que considera apenas o número observado de alelos) em comparação a \hat{H}_e (que considera frequências alélicas). No presente estudo, a máxima diversidade (\hat{H}_{\max}) foi calculada em 0,85. Como a diversidade gênica foi estimada em $\hat{H}_e = 0,608$, os marcadores SSR utilizados detectaram cerca de 70% da diversidade máxima possível.

Alguns estudos têm mostrado altos índices de diversidade gênica observada. Ciampi (1999) verificou que populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) localizadas no cerrado apresentaram 88% de diversidade gênica observada de uma diversidade máxima de 92%. Os estudos de Conte (2004) também detectaram alta diversidade gênica (84,4% de uma máxima de 93,1%) em populações de palmitreiro (*Euterpe*

edulis). Castellen (2005) em estudos populacionais de jatobá (*Hymenaea courbaril*) verificou 87,3% da diversidade máxima possível (89,5%).

A presença de alelos nulos nos locos é devida a mutações que podem ocorrer no local de hibridação do iniciador (CALLEN et al., 1993). Uma consequência deste polimorfismo é que ocorre o “mascaramento” de indivíduos heterozigóticos. Assim, a presença de alelos nulos ocasiona a diminuição das frequências estimadas de heterozigotos na população e como resultado tem-se superestimação dos valores de endogamia (PEMBERTON et al., 1995). O loco Cg 17 foi utilizado em vários estudos (CLOUTIER et al., 2007; VINSON et al., 2005), os quais não detectaram problemas com excesso de homozigotos, da mesma forma o loco Cg 05p que também se prestou para estudos populacionais (CLOUTIER et al., 2007; DAYANANDAN et al., 1999; KAGEYAMA et al., 2004). Com base nos resultados apresentados, pode-se sugerir que a presença de alelos nulos provavelmente é a causa do excesso de homozigotos nos locos Cg 17 e Cg 05p na população Rio Branco e que, provavelmente, devem ter ocorrido mutações nos locais de hibridação dos iniciadores nesta população, fato não observado na população Porto Acre.

A maioria dos locos na população Rio Branco não se ajustou às proporções de EHW. Nos locos Cg 17 e Cg 05p pode-se dizer que estes desvios estão ocorrendo devido à presença de alelos nulos. Já nos demais locos desta população e no loco Cg 12 da população Porto Acre os desvios do EHW provavelmente estão ocorrendo pela atuação do sistema reprodutivo e/ou de processos como a deriva genética, seleção, mutação e migração.

Em ambas as populações, as estimativas de \hat{A} , \hat{A}_e e \hat{H}_e foram muito próximas, e os valores de \hat{f} não diferiram de zero indicando que não ocorre endogamia nas populações. Como o índice de fixação foi praticamente nulo, as estimativas de tamanho efetivo populacional foram parecidas com o número de indivíduos coletados, fato que indica alta taxa de cruzamento nesta espécie, o que já era esperado já que ela é auto-incompatível.

O tamanho efetivo (\hat{N}_e) e a representatividade genética (\hat{N}_e/N) estão de acordo com os valores estimados de \hat{f} , que foram praticamente nulos, indicando que nas duas

populações o número de indivíduos coletados foi próximo das estimativas de \hat{N}_e . Vale ressaltar que a manutenção de um tamanho efetivo adequado diminui a probabilidade de ocorrência de oscilações genéticas e endogamia em populações naturais. Quanto maior o \hat{N}_e , menor a magnitude da deriva genética e da mesma forma, quanto maior sua magnitude menor será o efeito da endogamia na população. A taxa de cruzamento aparente foi alta para ambas as populações. Estes dados são congruentes com estudos de Cloutier et al. (2007) e Hall; Orrel e Bawa (1994) que verificaram uma taxa de polinização cruzada multilocos próxima a um para esta espécie. Maués (2006) verificou que na andiroba existem mecanismos de inibição da germinação do pólen na superfície do estigma, o que torna a espécie obrigatoriamente alógama.

Estudos em espécies arbóreas têm mostrado que o grau de diferenciação entre as populações é relativamente baixo e que a maior parte da diversidade genética se encontra dentro das populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984, KAGEYAMA et al., 2004). Hall; Orrel e Bawa (1994), estudando a diversidade genética de nove populações de andiroba na Costa Rica através de marcadores isoenzimáticos, verificaram que 95,4% da variação encontrava-se dentro das populações, e que a diferenciação entre populações (4,6%) aumenta como o aumento da distância entre as populações. Lemes et al. (2003), estudando populações de mogno (*Swietenia macrophylla*) na Amazônia brasileira com SSR também chegaram a esta conclusão.

A divergência entre as populações de *C. guianensis* do presente estudo foi intermediária (9,5%), o que já era esperado pelo fato de serem encontrados alguns alelos exclusivos nas duas populações com freqüências acima de 0,11 e também pela distância geográfica entre as duas. Seoane; Kageyama; Sebben (2000) citam que a presença de alelos exclusivos em algumas populações é indicativo de fluxo gênico restrito, o que pode levar a um aumento da divergência genética entre populações. Embora o fluxo gênico aparente tenha sido alto ($Nm = 2,38$ migrantes por geração), ele se refere ao fluxo que ocorreu no passado, quando as duas populações faziam parte de uma única grande população.

Luikart et al. (1998) sugerem que quanto antes se detectar um gargalo genético ("bottleneck"), maior será a probabilidade de que os efeitos deletérios deste evento possam ser evitados ou minimizados, já que os procedimentos mitigadores de manejo

poderão ser realizados. Moraes e Derbyshire (2003) estudando populações de *Cryptocarya aschersoniana*, uma espécie arbórea climácica, verificaram que todas as 12 populações estudadas apresentaram efeitos de gargalos genéticos causados provavelmente pela fragmentação florestal. De acordo com Luikart e Cornuet (1998), em uma população no equilíbrio de mutação e deriva, onde o tamanho efetivo permaneceu constante em um passado recente, há aproximadamente igual probabilidade de um loco mostrar excesso ou déficit de diversidade gênica. Situação que se apresentou para as populações de *C. guianensis* analisadas neste estudo, onde não se observaram indícios de ocorrência de gargalo genético.

2.3 Conclusões

As duas populações avaliadas de *Carapa guianensis* apresentaram índices elevados e similares valores de diversidade genética, não se observando a ocorrência de endogamia. A representatividade genética e a alta taxa de cruzamento sugerem que elas se reproduzem por alogamia.

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações revelou que 90,5% desta diversidade encontra-se dentro das populações. A divergência genética entre as duas populações (9,5%), estatisticamente significativa, sugere uma divergência intermediária.

Não está ocorrendo deriva genética nas populações avaliadas.

Referências

APPLIED BIOSYSTEMS. **Genescan 3.7**. Califórnia, 2001. 1 CD-ROM.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Genotyper 2.0**. Califórnia, 1996. 1 CD-ROM.

BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. A simple and cost effective method to synthesize a fluorescent labeled internal DNA standard for fragment sizing in an automatic sequencer. **Biotechniques**, Natick, v. 31, n. 4, p. 793-800, Oct. 2001.

BROOKFIELD, J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 453-455, June 1996.

CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A.; RICHARDS, R.I.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal Human Genetics**, Boston, v. 52, n.5, p. 922-927, May 1993.

CASTELLEN, M. S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Humanaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**. 2005. 104p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CIAMPI, A.Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de Copaíba (*Copaifera Langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado**. 1999. 204p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1999.

CLOUTIER, D.; PÓVOA, J.S.R.; PROCOPIO, L.C.; LEÃO, N.V.M.; WADT, L.H.O.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 54, n. 6, p. 270-274, Dec. 2005.

CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 797-809, Feb. 2007.

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from *F-statistics*. **Evolution**, Lancaster, v. 47, n. 3, p. 855-863, June 1993.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**. 2004. 124p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Baltimore, v.144, p. 2001-2014, Dec. 1996.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELE, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 1585-1592, Oct. 1999.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n.1, p. 13-15, Jan. 1987.

DUKE, J. Phytochemical and ethnobotanical databases. (USDA/ARS). **Chemicals and their biological activities in: *Carapa guianensis* AUBL. (Meliaceae) – Andiroba.** Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl>>. Acesso em: 26 nov. 2004.

FERRAZ, I.D.K., SAMPAIO, P.T.B. Métodos simples de armazenamento das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D.C. – Meliaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 26, n. 3, p. 137-144, Jul. Set. 1996.

FERRAZ, I.D.K., CAMARGO, J.L.C., SAMPAIO, P.T.B. Sementes e plântulas de andiroba (*C. guianensis* AUBL. e *C. procera* D.C.): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**, Manaus, v 32, n. 4, p. 661-647, out. dez. 2002.

GOODMAN, S.J. R_{ST} Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 881-885, Sept. 1997.

GOUDET, J. F_{SAT} version1,2: a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, Washington, v. 86, n. 6, p.485-486, Nov. 1995.

GOVERNO DO ESTADO DO ACRE. **O estado do Acre: Localização, área territorial e informações geográficas.** Disponível em: Disponível em: <<http://www.seiam.ac.gov.br>>. Acesso em: 10 out. 2006.

HALL, P.; ORREL, L.C.; BAWA, K. Genetic diversity and mating system in a tropical tree. *Carapa guianensis* (Meliaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 9, p. 1104-1111, Sept. 1994.

HOLLINGSWORTH, P.M.; DAWSON, I.K.; GOODALL-COPESTAKE, W.P.; RICHARDSON, J.E.; WEBER, J.C.; SOTELO MONTES, C.; PENNINGTON, R.T. Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n.2, p. 497-501, Fev. 2005.

- JANKOWSKY, I.P.; CHIMELO, J.P.; CAVALCANTE, A.A.; GALINA, I.C.M.; NAGAMURA, J.C.S. **Madeiras brasileiras**. Caxias do Sul: Spectrum, 1990. v. 1, 172p.
- KAGEYAMA, P.Y.; CARON, D.; GANDARA, F.B.; MARTINS, K.; WADT, L.H.O.; LACERDA, C.M.B.; BOUFLEUER, N.T.; RIBAS, L.A.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E.M. Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western Amazonian settlements. In: VINCETI, B.; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Orgs.). **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: IPGRI, 2004, p. 149-217.
- LEITE, A. M. C. **Ecologia de *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) “Andiroba”**. 1997. 180p. Tese (Doutorado em Botânica). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, 1997.
- LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 2875-2883, Nov. 2003.
- LESLIE, T. **The healing power of Rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinals**. New York: Square one Publishers, 2005. 535p.
- LEWIS, P.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer computer programe for the analyse of allelics data (software) 2002. version 1.0(d2). Disponível em: <<http://alleun.eeb.uconn.edu/gda>>. Acesso em: 20 nov. 2003.
- LOUREIRO, A.A.; SILVA, M.F.; ALENCAR, J.C. **Essências madeireiras da Amazônia**. Manaus: INPA/SUFRAMA. 1979. v. 2, 245p.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, n.1, p.65-95, Nov. 1984.
- LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from a allele frequency data. **Conservation Biology**, Boston, v. 12, n. 1, p. 228 – 237, Feb. 1998.

LUIKART, G.; ALLENDORF, F.W.; CORNUET, J.M.; SHERWIN, W.B. Distortion of alleles frequency distributions provides a test for recent population bottleneck. **The Journal of Heredity**, Washington, v.89, n.3, p.238 -247, May June 1998.

MACHADO, F.R.B.; VINSON, C.C.; SILVA, V.P.; CIAMPI, A.Y. Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53., 2002, Recife. **Resumo...** Recife: SSB. 2002. p. 79-80. Resumo 0251.

MAUÉS, M.M. **Estratégias reprodutivas de espécies arbóreas e sua importância para o manejo e conservação florestal: Floresta Nacional de Tapajós (Belterra-PA)**. 206p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MORAES, P.L.; DERBYSHIRE, M.T.V.C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Biota Neotropica**, Campinas, v. 3, n.1, 2003. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/>>. Acesso em: 20 out. 2005.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap.2, p. 29-56.

NOVICK, R.R.; DICK, C.W.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 11, p.2885-2893, Nov. 2003.

OOSTERHOUT, C.V.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, n.3, p. 535-538, Sept. 2004.

PEMBERTON, J.M.; SLATE, J.; BANCROFT, D.R.; BARRET, J.A. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, n.2, p. 249-252, Apr. 1995.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **The Journal of Heredity**, Washington, v.90, n. 1, p. 502-503, July 1999.

SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBEN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações e *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 57, p. 123-139, jun. 2000.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v. 139, n.1, p. 457-462, Jan.1995.

VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of the outcrossing rate. **Brazilian of Journal of genetics**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 349-351, Sept. 1994.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 6, p. 1912-1921, Nov. Dec. 2003.

VIANNA, N. G. **Conservação de sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)**. Belém: EMBRAPA/CPATU, 1982. 10p.

VINSON, C.C.; AZEVEDO, V.C.R.; SAMPAIO, I; CIAMPI, A.Y. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 33-34, Mar. 2005.

WEIR, B.S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics Bulletin**, Washington, v. 35, n. 1, p. 235-254, Mar. 1979.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates. 445p. 1996.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v.38, n. 6, p.1358-1370, Nov. 1984.

WHITE, G; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n.9, p.851-868, Sept. 1997.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, n.4, p. 323-354, July 1951.

3 ESTRUTURA GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL DE *Carapa guianensis* (AUBLET.), ESPÉCIE ARBÓREA DA FLORESTA AMAZÔNICA

RESUMO

A andiroba (*Carapa guianensis*) é uma espécie arbórea de importância econômica na região Amazônica pelo grande interesse que vem despertando nas indústrias madeireira e cosmética. Sua madeira é empregada na fabricação de móveis, na construção civil e na indústria naval. O óleo retirado de suas sementes contém propriedades anti-sépticas, antiinflamatórias, cicatrizantes e inseticidas, sendo muito procurado pelas indústrias farmacêutica e cosmética. Ocorre em alta frequência em floresta de terra firme e de baixo, sendo que neste último ambiente atinge maior diâmetro e densidade populacional. Este estudo teve como objetivo quantificar a estrutura genética de uma população natural de andiroba, localizada em área de Floresta Tropical Úmida no Estado do Acre. Comparou-se a diversidade genética em três classes de tamanho, considerando-se dois ambientes: terra firme e baixo. Foram utilizados sete locos microssatélites que possibilitaram avaliar 957 indivíduos (451 plântulas, 249 jovens e 257 adultos). Foi observado um total de 85 alelos na população total, sendo 67 no ambiente de terra firme e 70 no baixo. A população total apresentou uma média de 12,14 alelos por loco e diversidade gênica média (\hat{H}_e) de 0,608. A heterozigosidade observada média (\hat{H}_o) foi de 0,583. O loco Cg 05p apresentou frequência estimada de alelos nulos significativa a 5% para as três classes de tamanho. A maioria dos locos não aderiu ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A diversidade gênica foi semelhante nas três classes de tamanho na população total ($\hat{H}_e = 0,603$, 0,607 e 0,616, respectivamente, para plântulas, jovens e adultos) e nos dois ambientes ($\hat{H}_e = 0,609$, 0,607 e 0,612, respectivamente, para plântulas, jovens e adultos na terra firme, e $\hat{H}_e = 0,591$ para plântulas e jovens e $\hat{H}_e = 0,607$ para adultos no ambiente de baixo). Não foi observada endogamia em nenhuma das classes de tamanho dos ambientes. A representatividade genética (\hat{N}_e/N) foi superior a 95% em todas as classes de tamanho nos dois ambientes. A taxa de cruzamento aparente foi próxima de 100% tanto para os ambientes como para a população total. Os valores estão congruentes com os outros parâmetros intrapopulacionais, indicando que esta espécie é predominantemente alógama. Considerando-se a população total, não foi observada divergência genética entre as classes de tamanho. Já entre os indivíduos do ambiente de terra firme e os do baixo esta divergência foi baixa (1,63%), mas significativa, indicando que a maior parte da variabilidade genética está concentrada dentro dos ambientes e não entre eles. Os resultados aqui obtidos, em conjunto com dados ecológicos, poderão ser utilizados futuramente para o planejamento adequado de planos de manejo sustentável tanto de sementes como indivíduos adultos desta espécie.

Palavras-chave: Andiroba; Arbórea tropical; *Carapa guianensis*; Diversidade gênica; Estrutura populacional; Marcadores microssatélites

INTRAPOPOPULATIONAL GENETIC STRUCTURE OF *Carapa guianensis* (AUBLET.), AN AMAZONIAN TREE SPECIES

ABSTRACT

Crabwood (*Carapa guianensis*) is a tree of economic importance in the Amazon region, due to the great interest it has been attracting in the wood and cosmetics industries. Its wood is used in the manufacture of furniture, in civil construction, and in the naval industry. The oil extracted from its seeds has antiseptic, anti-inflammatory, wound-healing and insecticide properties, and it is much sought-after by the pharmaceutical and cosmetics industries. It occurs at a high frequency in upland and lowland forests, reaching, in the latter case, a greater diameter and population density. This study sought to qualify the genetic structure of a natural crabwood population, located in an area of Tropical Rainforest, in the State of Acre. The genetic diversity was compared in three size classes, considering two habitats: upland and lowland. Seven microsatellite loci were used, enabling the investigation of 957 individuals (451 seedlings, 249 young and 257 adults). A total of 85 alleles was observed in the total population, 67 in the upland habitat and 70 in the lowland. The total population presented an average of 12.14 alleles per locus and an average gene diversity (\hat{H}_e) of 0.608. The average observed heterozygosity (\hat{H}_o) was 0.583. Locus Cg 05p showed an estimated frequency of significant null alleles of 5% for the three size classes. The majority of the loci did not adhere to the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). The gene diversity was similar in the three size classes in the total population ($\hat{H}_e = 0.603, 0.607$ and 0.616 , for seedlings, young and adult plants, respectively), and in the two habitats in the uplands ($\hat{H}_e = 0.609, 0.607$ and 0.612 for seedlings, young and adults, respectively, in upland, and $\hat{H}_e = 0.591$ for seedlings and young individuals and $\hat{H}_e = 0.607$ for adults in the lowland habitat). No inbreeding was observed in any of the size classes of either habitat. The genetic representativity (\hat{N}_e/N) was higher than 95% in all the size classes, in both habitats. The apparent outcrossing rate was close to 100%, for both the habitats and for the total population. The values are congruent with the other intrapopulation parameters, indicating that this species is predominantly outcrossed. Considering the total population, no genetic divergence was observed between size classes. Between individuals in the upland habitat and those of the lowland habitat, this divergence was low (1.63%), but significant, indicating that most of the genetic variability

is concentrated within the two habitats, and not between them. The results obtained here, in conjunction with ecological data, may be of future use in the creation of sustainable management plans, both for seeds and adult individuals of this species.

Keywords: Crabwood; Tropical trees; *Carapa guianensis*; Genetic diversity; Population structure; Microsatellite markers

3.1 Introdução

A degradação das florestas tropicais em todo o mundo tem aumentado nas últimas décadas. Este fato tem ocorrido tanto pela extração da madeira como pelo aumento na exploração de produtos não madeireiros. O aumento na retirada de produtos florestais ameaça a manutenção da biodiversidade e de processos biológicos nestes ambientes, ocasionando sérias conseqüências em longo prazo na manutenção da diversidade genética de populações naturais. A diversidade é a responsável por parte das diferenças de produtividade, adaptação e reprodução entre os indivíduos de uma espécie (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005).

As espécies arbóreas são fundamentais na estrutura dos ecossistemas florestais, servindo de nicho e sombra para espécies arbustivas e herbáceas, sustentando epífitas e lianas, além de fornecer alimento e moradia a vários tipos de animais. Portanto, estudos que visem obter informações sobre as características ecológicas e genéticas destas espécies se tornam cada vez mais necessários para estimar e mitigar os efeitos genéticos do desmatamento e do manejo florestal.

A andiroba (*Carapa guianensis* Aublet.) é uma espécie arbórea clímax de crescimento rápido, pertencente à família das meliáceas. Pode ser encontrada desde a América Central até o norte da América do Sul (Venezuela, Equador, Colômbia, Peru e Brasil) (FERRAZ; SAMPAIO, 1996; LEITE, 1997). No Brasil, ocorre em toda a bacia Amazônica, principalmente nas várzeas próximas aos leitos dos rios, mas é encontrada também em locais bem drenados de terra firme (JANKOWSKY et al., 1990; LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979).

Quando adulta pode atingir mais de 30 m de altura. É uma árvore decídua de dossel a subdossel (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002), possui tronco reto e cilíndrico, e geralmente apresenta raízes tabulares (RIZZINI, 1971). É uma planta monóica, com floração assincrônica e prolongada, sendo polinizada por insetos de pouca mobilidade como microlepidópteros e meliponinas (MAUÉS, 2006), auto-incompatível (HALL; ORREL; BAWA, 1994; MAUÉS, 2006) e com elevada densidade populacional nas áreas de ocorrência.

Apresenta potencial econômico para uso múltiplo, sua madeira tem propriedades físicas e mecânicas similares ao cedro (*Cedrela fissilis*), à cerejeira (*Torresea acreana*)

e ao mogno (*Swietenia marophylla*) (ARAÚJO, 2002). Apresenta boa trabalhabilidade, e é resistente ao ataque de cupins, mas não durável na unidade (MAUÉS, 2006). É empregada na fabricação de móveis, na construção civil e na indústria naval (VIANNA, 1982). O óleo retirado de suas sementes, conhecido na região Amazônica como “azeite de andiroba”, tem coloração amarelo-clara e é extremamente amargo (LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979). Contêm substâncias como o ácido oléico, o palmítico e o esteárico, que lhes conferem propriedades anti-sépticas, antiinflamatórias, cicatrizantes e inseticidas (DUKE, 2004; LESLIE, 2005; LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979). O óleo é empregado nas indústrias farmacêutica e cosmética.

O estudo da variabilidade genética em espécies florestais ganhou maior ênfase com o uso de marcadores moleculares, que possibilitaram a observação da variação das espécies ao nível do DNA. Vários trabalhos têm sido realizados nestas espécies com o objetivo de obter informações sobre a estrutura genética entre indivíduos de gerações diferentes em uma mesma espécie (ALDRICH et al., 1998; CLOUTIER et al., 2007; DAYANANDAN et al., 1999; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; HALL; CHASE; BAWA, 1994; KAGEYAMA et al., 2004; LESPSCH-CUNHA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999) e entre populações diferentes (CÉSPEDES et al., 2003; HALL; ORRELL; BAWA, 1994; LEMES et al., 2003; NOVICK et al., 2003; WHITE; POWELL, 1997).

Os primeiros trabalhos analisando a diversidade genética e sistema reprodutivo em *C. guianensis* foram realizados na década de 90 com o uso de isoenzimas (HALL ORRELL; BAWA, 1994). Já no final desta década Dayanandan et al. (1999) desenvolveram marcadores microssatélites (SSR) para avaliar a estrutura populacional desta espécie em áreas onde ocorre manejo florestal. Kageyana et al. (2004) foram pioneiros no estudo desta espécie no Brasil, utilizando os SSR para avaliar a estrutura genética de duas populações divididas por classe de tamanho no Estado do Acre. Vinson et al. (2005) desenvolveram mais marcadores microssatélites para *C. guianensis*, para dar suporte aos estudos genéticos do projeto Dendrogene (Conservação Genéticas em Florestas Manejadas na Amazônia), visto que alguns dos iniciadores (“primers”) desenvolvidos por Daynandan et al. (1999) eram monomórficos nas populações brasileiras. Cloutier et al. (2005) utilizaram microssatélites

cloroplastidiais para o estudo do efeito da dispersão hidrocória de sementes de andiroba na Amazônia brasileira.

O uso dos SSR tem sido uma ferramenta importante para verificar a estrutura das populações antes e depois do manejo florestal, onde ocorre o corte seletivo das árvores de maior diâmetro e com isso pode-se ter uma redução do fluxo gênico e aumento de endogamia. Cloutier et al. (2007) verificaram que o manejo florestal em uma área da Floresta Nacional Tapajós, no Pará, não promoveu alterações na diversidade genética na população de *C. guianensis* que foi avaliada antes e após o corte seletivo.

Estudos genéticos em indivíduos de gerações diferentes de uma única população são essenciais para se verificar como que ocorre a distribuição da variabilidade genética entre as diferentes classes de tamanho. Em várias espécies verifica-se que a heterozigosidade observada aumenta com a classe de idade (ALDRICH et al. 1998; DOLIGEZ; JOLY, 1997; EGUIARTE; PEREZ-NASSER; PIÑERO, 1992; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; LEPSCH-CUNHA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999; RIBAS; KAGEYAMA, 2004; SEBBEN et al., 2000). Este fato pode ser uma estratégia adaptativa destas espécies, onde a seleção natural atuaria eliminando os indivíduos endogâmicos, já que os heterozigóticos por apresentarem dois alelos diferentes podem possuir maior plasticidade genética.

Dentro deste contexto, o presente trabalho propôs-se a estudar uma população de *C. guianensis* localizada em dois ambientes distintos. Com este estudo pretendeu-se responder às seguintes questões: a) qual o padrão de distribuição populacional para jovens e adultos nesta população?; b) qual o padrão de distribuição populacional para jovens e adultos nos dois ambientes: terra firme e baixo; c) existe variação na diversidade genética entre as diferentes classes de tamanho e entre os diferentes ambientes?; d) existe fluxo gênico entre os ambientes?

Estes parâmetros de estudo são importantes, pois permitem entender como é que ocorre a distribuição da variabilidade genética em uma única população, sendo estes dados interessantes a se considerar quando se definem estratégias de manejo com o objetivo de se utilizar adequadamente os recursos genéticos desta espécie, tanto para o setor madeireiro como para o não-madeireiro.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Área de estudo

O Estado do Acre é um dos nove estados brasileiros que compõem a chamada Amazônia Legal. Fica situado num planalto com altitude média de 200 m, localizado a sudoeste da Região Norte, entre as latitudes 07° 05' 30" S, 11° 10' 50" S e longitudes de 66° 35' 40" W, 74° 01' 30" W. Faz divisa com os Estados do Amazonas (N) e Rondônia (L) e fronteira com a Bolívia (SE) e o Peru (S e O). A economia acreana se baseia no agro-extrativismo, na pecuária e na indústria madeireira (GOVERNO DO ESTADO DO ACRE, 2006).

O estudo foi realizado em área de Reserva Florestal da Embrapa Acre (Latitude: 10° 01' 28" S e Longitude: 67° 42' 19" W), no município de Rio Branco/AC (Figura 1). A temperatura média anual é de 24,5°C, com uma estação seca que ocorre entre os meses de junho a agosto. A vegetação dominante nesta região é classificada como mata de floresta tropical úmida. A região possui topografia ligeiramente ondulada tendo áreas mais altas (terra firme) e áreas ocasionalmente inundadas (baixio).

3.2.1.2 Coleta das amostras

Foram demarcadas duas parcelas de 16 hectares (400m x 400m) cada, uma em ambiente de terra firme e outra no baixio. A distância máxima entre as duas áreas foi de 1000 metros e mínima de 500 m (Figura 2). Todos os indivíduos de *C. guianensis* com DAP maior ou igual a 15 cm foram mapeados e marcados com plaquetas metálicas devidamente numeradas. Foram coletadas amostras foliares de todos os indivíduos marcados nas parcelas. O número total de indivíduos com DAP \geq 15 cm mapeados foi 506, sendo 204 em ambiente de terra firme e 302 no baixio. Esses foram divididos em duas classes de tamanho de acordo com o DAP. Foram incluídos na classe Jovens aqueles com mais de 10 m de altura, com DAP entre 15 a 25 cm e na classe Adultos os indivíduos com mais de 10 m de altura e com DAP maior que 25 cm (Figura 3).

Em seguida, foram selecionadas ao acaso 20 árvores reprodutivas em cada ambiente, para coleta de no mínimo 12 plântulas que se localizavam sob a copa dessas árvores. Foram incluídos na classe Plântulas os indivíduos com até 50 cm de altura e

que apresentavam de dois a seis pares de folhas. O número total de plântulas coletadas foi 217 na terra firme e 234 no baixio (Figura 3).

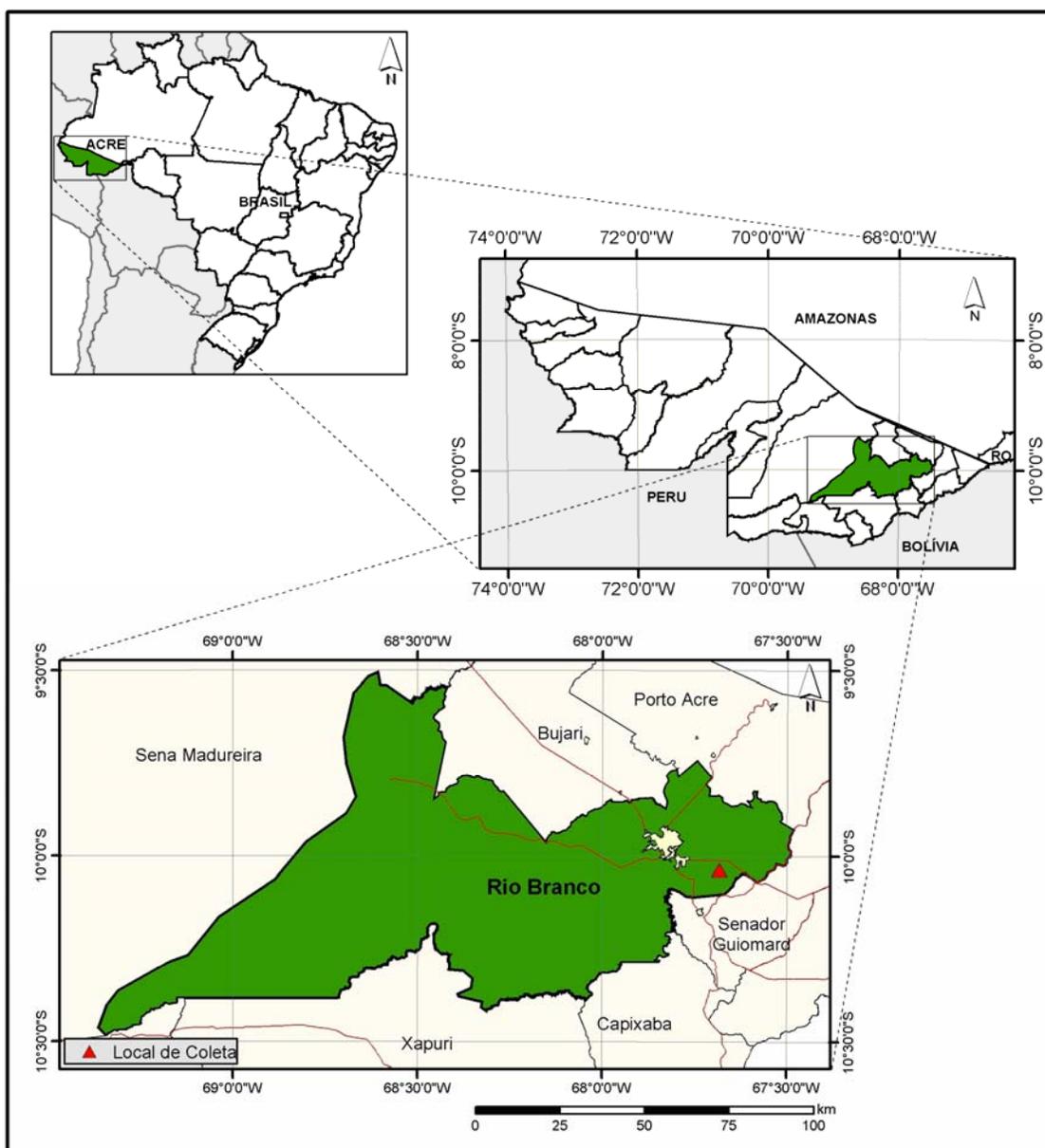
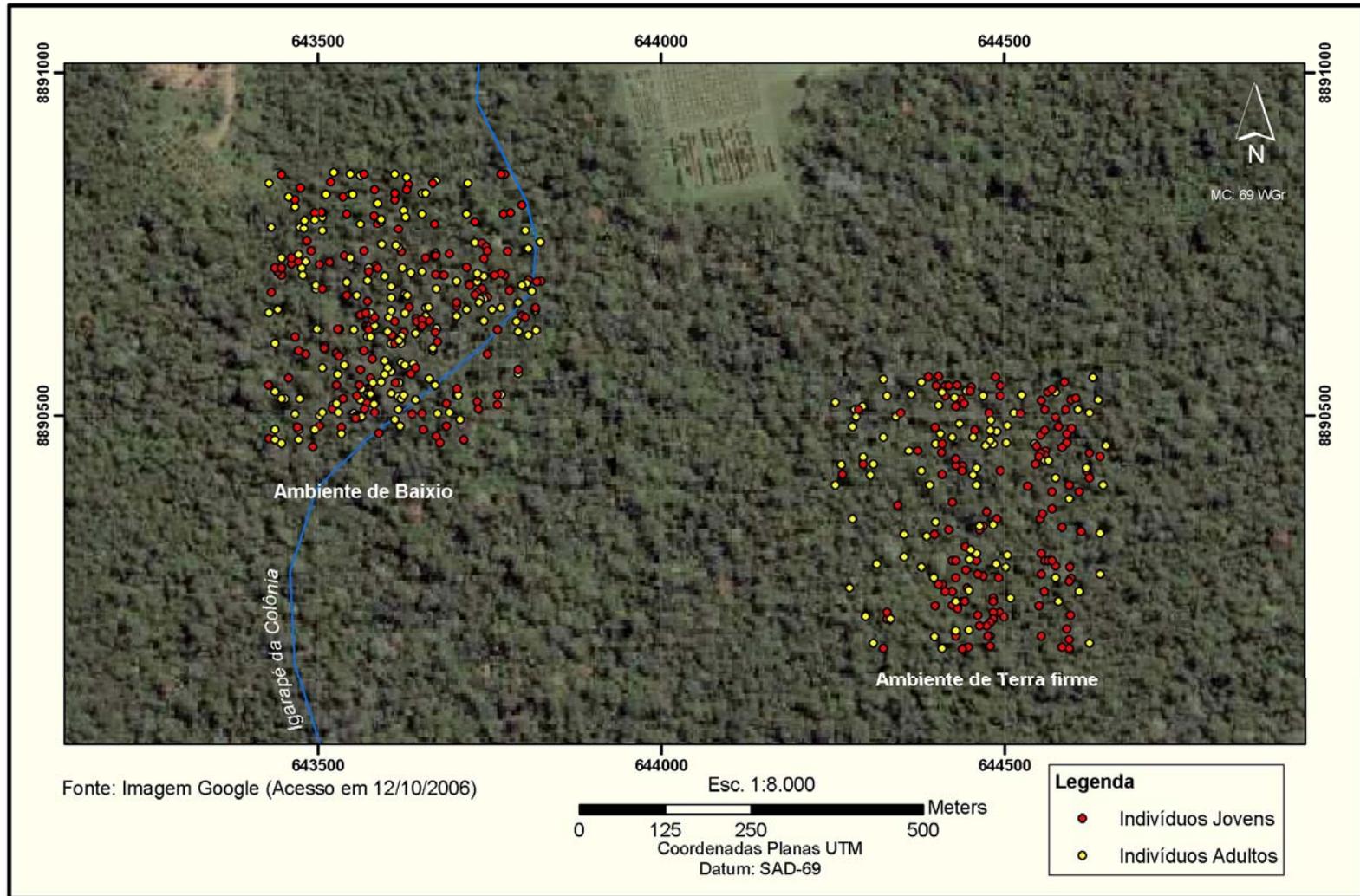


Figura 1 - Mapa de localização da área de coleta de *Carapa guianensis*, no município de Rio Branco/AC. O triângulo vermelho representa o local onde ocorreram as coletas



2 – Espacialização das plantas de *Carapa guianensis* coletadas na área de Reserva Florestal da Embrapa Acre

Todas as 957 amostras foram secas imediatamente após a coleta em recipientes contendo sílica gel e enviadas para o Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em Brasília/DF, onde foram realizadas as análises genéticas.

A divisão em classes de tamanho foi realizada para avaliar se ocorrem variações nos parâmetros genéticos entre as três classes. Como a população foi coletada em dois ambientes distintos, verificou-se também se estas variações ocorrem entre os ambientes de terra firme e baixio.

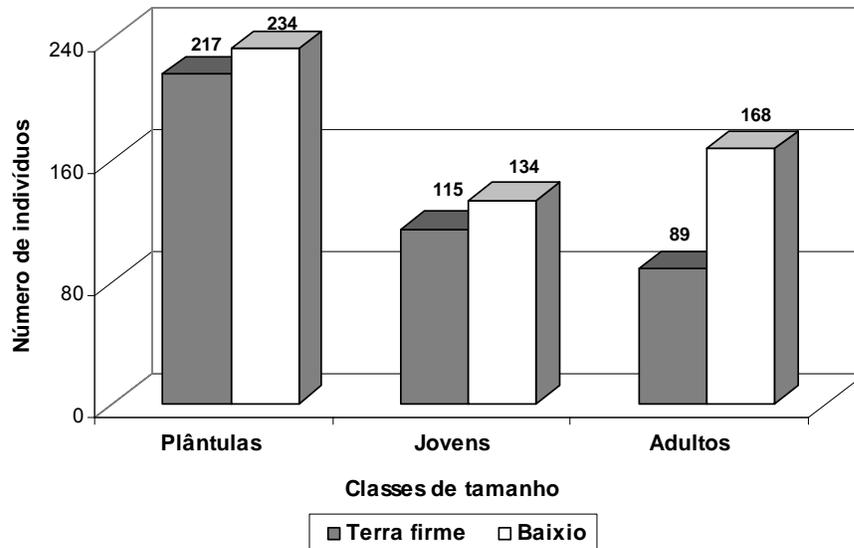


Figura 3 – Número de indivíduos de *Carapa guianensis* (andiroba) coletados em ambiente de terra firme e de baixio, na Reserva Florestal da Embrapa-Acre

3.2.1.3 Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o procedimento de CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1987) adaptado por Machado et al. (2002) que utiliza a máquina Fastprep – BIO 101 SAVANT para a trituração do material vegetal ao invés de nitrogênio líquido.

Aproximadamente 30 mg de folhas secas foram colocadas em microtubos de 2 ml contendo uma conta de cerâmica grande e sobre as amostras foi colocada uma conta de porcelana pequena. Adicionou-se 700 µl de tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2 M de EDTA, 1% de PVP, 0,1 M de Tris-HCl) previamente aquecido a 65°C, acrescido de 2% de β-mercaptoetanol. Os microtubos foram levados para a máquina Fastprep por 40 segundos, e em seguida colocados em banho-maria à temperatura de 65°C durante 60 minutos.

Após este tempo foi acrescentado a cada microtubo 600 µl de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico), que é um solvente orgânico, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. Com este procedimento, obteve-se a separação das fases aquosa e orgânica.

Foram retirados aproximadamente 500 µl do sobrenadante (fase aquosa) e transferidos para microtubos de 1,5 ml. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 400 µl de isopropanol a -20°C. Os microtubos foram mantidos a -20°C por cerca de 30 minutos e, em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos, para formação do precipitado de DNA (“pellet”).

O isopropanol foi descartado, e o “pellet” foi lavado duas vezes com adição de 500 µl de etanol 70%, com agitação vigorosa e centrifugação. Foi feita uma terceira lavagem com adição de 500 µl de etanol absoluto. Este foi retirado gentilmente e os “pellets” ficaram secando à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, foram acrescentados 30 a 50 µl de solução TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA) com RNase (0,5 mg) aos microtubos com a finalidade de ressuspender o DNA do “pellet”.

Depois de extraído, o DNA genômico foi quantificado por meio da análise comparativa de cada amostra com o DNA fago λ de peso conhecido (20 a 200 ng) em eletroforese em géis de agarose 1% (0,3 g de agarose; 30 ml TBE 1X - 93 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA ; 4,5 µl de brometo de etídio (1 mg/ml)).

A concentração das amostras foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência de suas bandas com as do DNA padrão. Posteriormente, o DNA foi diluído em água MilliQ a 1ng/µl.

3.2.1.4 Análises genéticas

Foram utilizados sete pares de iniciadores específicos para *Carapa guianensis*, cinco desenvolvidos por Vinson et al. (2005) (Cg 01, Cg 06, Cg 12, Cg 16 e Cg 17), e dois por Dayanandan et al. (1999) (Cg 05, Cg 07, chamados aqui de Cg 05p e Cg 07p, respectivamente). As seqüências “forward” e “reverse” de cada loco microssatélite estão apresentadas na Tabela 1. O iniciador “forward” de cada loco foi marcado com um fluorocromo específico (HEX, 6-FAM e NED).

Tabela 1 – Seqüência dos pares de iniciadores polimórficos que amplificaram locos microssatélites (SSR) em *Carapa guianensis*, com as respectivas amplitudes alélicas em pares de base, temperatura de hibridação (T_a) e número total de alelos por loco (\hat{A})

Loco	Fluorocromo	Seqüência do primer (5' – 3')	Amplitude Alélica (pb)	T_a ($^{\circ}$ C)	\hat{A}
Cg 01	NED	F: CCT GGG A CG TAT T TC TGC TG R: GCA GCA GCA CCT CTC TCT TT	170-204	56	10
Cg 06	NED	F: ACC CTC GCC TCC TTT GTT R: TGA GTC GAC ATG TGT CAG CA	132-156	56	7
Cg 12	6-FAM	F: TGA AAA GAC CAA TGC ATG AGA R: CAT TGC GGG TAC ACA GTT T	145-165	52	7
Cg 16	6-FAM	F: CGC TAT TGA GCG TGT GAG AC R: GTG GGA GCA GAT CTG AAA GC	153-183	56	14
Cg 17	6-FAM	F: ATT TAG GCC ATT GCA GGC TA R: ACG TTT GGT ATC GGA ACT GC	199-235	52	15
Cg 05p	HEX	F: TGC ATT TCT TCT CCT TGC TTC TGG R: TCT TGT ACG TTG GCT CTT GCA CAT TC	168-204	56	14
Cg 07p	HEX	F: AAG ACT TCC CCC AGA TTT GTT TTT R: TGT ACC AGT TCA GTT GAT GCT CA	198-254	52	18

Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados um ou dois locos de SSR por reação. Utilizou-se o iniciador “forward” de cada loco marcado com um fluorocromo diferente, ou com o mesmo fluorocromo, porém com amplitudes alélicas distintas, por reação.

As reações de PCR foram otimizadas para 6 μ l de volume final, contendo 1 ng de DNA genômico; 1X de tampão de reação da PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl,

1,5 mM de MgCl₂, pH 8,3, Phoeutria); 0,25 µM de cada iniciador (“forward” marcado e “reverse”); 0,27 ng/ml de BSA (Albumina Sérica Bovina, Biolabs); 0,27 mM de dNTP e 0,125 U Taq polimerase (Phoeutria) e água MilliQ autoclavada.

As amplificações foram realizadas utilizando os termocicladores 9600 e 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica para cada par de iniciadores por 1 minuto (Tabela 1), 72 °C por 1 minuto e terminando com uma etapa de alongamento a 72°C por 7 minutos.

O produto das reações foi diluído na proporção 1:3 (1 µl de reação para 3 µl de água MilliQ). Em seguida, 1 µl dessa diluição foi colocado em placa microtitulação de 96 poços, que continha 9 µl de formamida HiDi, 0,25 µl de marcador interno fluorescente (ROX) (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001) e 0,75 µl de água MilliQ. Após a desnaturação (95°C por 3 minutos), a placa foi levada para o seqüenciador ABI 3700 da Perkin Elmer, onde ocorreu a eletroforese e detecção dos fragmentos amplificados.

Os fragmentos de DNA de tamanhos diferentes foram separados através de um sistema de eletroforese capilar. A automação da genotipagem, por meio da utilização do seqüenciador, possibilitou maior precisão e agilidade na determinação dos alelos de SSR.

A detecção e a estimativa do tamanho dos alelos em pares de base foram realizadas com o uso do programa GeneScan (APPLIED BIOSYSTEMS versão 3.7, 2001). Em seguida os valores foram importados para o programa Genotyper (APPLIED BIOSYSTEMS versão 2.0, 1996) para filtragem de picos, interpretação e compilação final dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo.

Para cada loco as estimativas do tamanho dos alelos em pares de base foram determinadas como sendo par ou ímpar de acordo com o tamanho previsto no desenvolvimento do marcador. Alelos com tamanho estimado intermediário às classes esperadas foram definidos como alelos da classe mais próxima (inferior ou superior) com maior frequência.

3.2.1.5 Análise Estatística

3.2.1.5.1 Avaliação dos locos

Os sete locos foram avaliados com uso do programa Micro-checker que identifica erros de genotipagem, permitindo verificar a presença de alelos que não são amplificados (alelos nulos), a dominância de alelos curtos e a presença de “stutters” (bandas duplicadas) (OOSTERHOUT et al., 2004). Quando há alelos nulos nos locos, os erros de genotipagem podem resultar em déficit no número observado de heterozigotos, causando desvios nas proporções de EHW.

O método utilizado para estimar a freqüência de alelos nulos (r) em cada loco foi o Estimador 1 de Brookfield (1996):

$$r = \frac{(H_e - H_o)}{(1 + H_e)}$$

Em que:

r = freqüência de alelos nulos

H_o = heterozigosidade observada, que é medida por $n2/(n1+n2)$, onde $n1$ é o número de uma banda individual e $n2$ é o número de duas bandas individuais na amostra.

H_e = heterozigosidade esperada, que é calculada como a soma dos produtos de todas as freqüências observadas ($\sum p_i p_j$, com $i \neq j$).

Esse método assume que a deficiência de heterozigotos observada é devido à presença de alelos nulos e não causada pelo Efeito de Wahlund, endogamia, cruzamento entre parentes, etc.

3.2.1.5.2 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As freqüências alélicas e genotípicas de cada loco foram submetidas ao teste exato de Fisher para verificar a aderência às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, como descrito por Weir (1996), com a utilização do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002).

3.2.1.5.3 Desequilíbrio genotípico entre pares de locos

O teste de desequilíbrio genotípico entre pares de locos foi realizado com uso do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002), que utiliza a média composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (WEIR, 1979). Por esse procedimento, genótipos de dois locos são associados várias vezes. Para locos nucleares, espera-se que não ocorra associação entre os pares de locos.

3.2.1.5.4 Diversidade genética

As freqüências alélicas foram estimadas para as plântulas, jovens e adultos da população como um todo e também analisando-se separadamente os indivíduos dos ambientes de terra firme e baixo por: $\hat{p}_{ij} = (n_{ij}/n_j)$, em que \hat{p}_{ij} = freqüência do alelo i na população j ; n_{ij} = número de ocorrências do alelo i na população j ; n_j = número total de alelos amostrados na população j ; com o uso do programa F_{STAT} (GOUDET, 1995).

A diversidade genética intrapopulacional foi estimada utilizando-se o programa estatístico GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002). Os parâmetros obtidos foram: número médio de alelos por loco (\hat{A}), diversidade gênica (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e índice de fixação (\hat{f}). A máxima diversidade possível (\hat{H}_{max}) em cada loco foi calculada a partir do número de alelos observados, em que: $H_{max} = (\hat{A} - 1) / \hat{A}$.

A estimacão de \hat{A} foi obtida pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos; o número efetivo de alelos por loco (\hat{A}_e) foi calculado a partir de $\hat{A}_e = 1 / (1 - \hat{H}_e)$; a diversidade gênica foi obtida a partir de $\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$, onde: p_i é a freqüência alélica estimada do i -ésimo alelo; a heterozigosidade observada (\hat{H}_o) para cada loco foi estimada por: $\hat{H}_o = 1 - \sum p_{ii}$ onde p_{ii} é a freqüência de genótipos homozigotos. O índice de fixação (\hat{f}) foi estimado de acordo com Weir (1996):

$$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e}$$

Para verificar se os valores médios de \hat{f} eram diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança a 99% de probabilidade pelo método de reamostragem “bootstrap”, utilizando-se 10.000 reamostragens sobre os locos pelo programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002).

A taxa de cruzamento aparente foi estimada conforme o procedimento descrito por Weir (1996) e Vencovsky (1994) de acordo com a relação:

$$\hat{t}_a = \frac{(1 - \hat{f})}{(1 + \hat{f})}$$

Em que:

\hat{t}_a = taxa de cruzamento aparente;

\hat{f} = índice de fixação.

O tamanho efetivo de uma população (\hat{N}_e) depende do número de indivíduos que efetivamente participam da reprodução e de sua contribuição relativa para a geração seguinte (CROSSA; VENCOVSKY, 1994). Ele é, portanto, uma medida de representatividade genética, sendo amplamente utilizado nas atividades de preservação de germoplasma, coleta de sementes e conservação “in situ”.

A manutenção de um tamanho efetivo adequado diminui a probabilidade de ocorrência de oscilações genéticas e endogamia em populações naturais. Quanto maior o \hat{N}_e menor a magnitude da deriva genética e, da mesma forma, quanto maior sua magnitude menor será o efeito da endogamia na população.

O tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e) foi estimado de acordo com Vencovsky e Crossa (2003):

$$\hat{N}_e = \frac{n}{(1 + \hat{f})}$$

Em que:

n = tamanho amostral;

\hat{f} = índice de fixação.

A representatividade genética das amostras foi testada a partir da relação entre o tamanho efetivo populacional e o tamanho amostral (\hat{N}_e/N).

Adicionalmente, a divergência genética ($\hat{\theta}_p$) entre os ambientes (terra firme e baixo) e entre as classes de tamanho foram estimadas de acordo com Weir (1996). Para verificar se a estimativa média desse parâmetro era estatisticamente diferente de zero, estimou-se o intervalo de confiança de 99% de probabilidade pelo método de reamostragem “bootstrap” utilizando 10.000 reamostragens sobre os locos. As análises de variância e os “bootstraps” foram estimados com uso do programa estatístico GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002).

O fluxo gênico aparente (Nm) entre os ambientes de terra firme e baixo foi estimado pelo método indireto calculado de acordo com o modelo proposto por Wright (1951) segundo a fórmula:

$$Nm = \frac{1}{4} \left[\frac{1}{\hat{F}_{ST}} - 1 \right]$$

Em que:

m = taxa de migração;

N = tamanho populacional;

Nm = número de migrantes/geração.

O \hat{F}_{ST} foi substituído pelo $\hat{\theta}_p$, conforme sugerem Cockerham e Weir (1993), para uma estimação não viesada do fluxo gênico.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Amostragem e caracterização dos locos

Foram coletados 957 indivíduos na população total (451 plântulas, 249 jovens e 257 adultos). Observando-se separadamente cada ambiente, na terra firme foram

coletados 421 indivíduos (217 plântulas, 115 jovens e 89 adultos) e no baixo 536 (234 plântulas, 134 jovens e 168 adultos).

Com os sete locos polimórficos de microssatélites nucleares utilizados, foram observados na população total 85 alelos. O loco Cg 07p foi o mais polimórfico, apresentando 18 alelos. Já os locos Cg 06 e Cg 12 foram os que apresentaram menor polimorfismo, com sete alelos cada, (Tabela 1, no Anexo).

Observando separadamente os indivíduos situados nos dois ambientes, verificou-se que na terra firme o loco mais polimórfico foi também o Cg 07p (15 alelos) e o loco com menor polimorfismo foi Cg 06 (cinco alelos), sendo observado para esse ambiente um total de 67 alelos. No ambiente de baixo, os locos mais polimórficos foram Cg 16, Cg 05p e Cg 07p (14 alelos cada), e o loco com menor polimorfismo foi o Cg 01 (cinco alelos), em um total de 70 alelos (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de alelos por loco nos ambientes de terra firme e baixo e na população total

Locos	Terra Firme				Baixo				Total			
	P	J	A	Total	P	J	A	Total	P	J	A	Total
Cg 01	9	6	5	10	4	3	3	5	9	6	6	10
Cg 06	4	5	4	5	3	4	7	7	4	6	7	7
Cg 12	4	6	5	6	5	4	5	6	5	6	6	7
Cg 16	8	6	6	8	8	11	13	14	8	11	13	14
Cg 17	10	5	7	13	6	8	6	10	10	9	9	15
Cg 05p	9	9	7	10	10	12	12	14	11	13	12	14
Cg 07p	15	10	10	15	11	11	11	14	17	11	12	18
Total	59	47	44	67	47	53	57	70	64	62	65	85

Nota: P = Plântulas; J = Jovens e A = Adultos

Embora as freqüências alélicas tenham oscilado entre as três classes de tamanho (Tabela 1, no Anexo), observou-se que na maioria dos locos os alelos mais freqüentes eram os mesmos encontrados nas três classes estudadas. Na classe das plântulas, o alelo 142 do loco Cg 06 apresentou a freqüência alélica mais elevada

(0,789) e para jovens e adultos, o alelo 200 do loco Cg 01 foi o alelo mais comum (0,803 e 0,807, respectivamente).

A magnitude da diversidade gênica de cada loco nas três classes de tamanho foi avaliada por meio da comparação da estimativa da diversidade gênica (\hat{H}_e) com a máxima diversidade possível de acordo com o número de alelos observados ($\hat{H}_{\max} = (\hat{A} - 1) / \hat{A}$). Para todo o conjunto de dados, \hat{H}_e foi de 60,8% numa diversidade máxima possível de 96,8%. Logo, a diversidade gênica (\hat{H}_e) observada representa 66,73% da máxima diversidade possível (Tabela 3).

Os locos Cg 16 e Cg 05p foram os que apresentaram diversidade gênica mais elevada, uma vez que os dados explicam 89,65% e 85,23% da diversidade total possível. Os locos Cg 17, Cg 06, Cg 12 e Cg 07p apresentaram estimativas de diversidade intermediária, e o loco Cg 01 apresentou estimativa baixa.

As estimativas do número efetivo de alelos por loco (\hat{A}_e) foram inferiores ao número médio de alelos por loco (\hat{A}) em todos os sete locos estudados. Isso indica que embora os locos tenham sido altamente polimórficos, há muitos alelos de baixa frequência.

Com relação à frequência de alelos nulos, estimada pelo método de Brookfield (1996), ocorreram desvios significativos a 5% no loco Cg 17 para as plântulas e no loco Cg 05p para as três classes de tamanho (Tabela 4).

O modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) possibilita verificar se as frequências genotípicas encontram-se nas proporções esperadas para cruzamentos aleatórios e quando não estão sofrendo efeitos de processos evolucionários como a deriva genética, seleção, mutação e migração. Desvios nas proporções de EHW podem ser causados por estes fatores e também pelo sistema misto de reprodução. Através das probabilidades do Teste Exato de Fisher (Tabela 5) verificou-se que ocorrem desvios no EHW na maioria dos locos, nas três classes de tamanho estudadas.

Tabela 3 – Estimativas de parâmetros genéticos obtidos para sete locos de SSR, em *Carapa guianensis*, em que N : número médio de indivíduos analisados; \hat{A} : número de alelos por loco; \hat{A}_e : número efetivo de alelos por loco; \hat{H}_o : heterozigosidade observada; \hat{H}_e : diversidade gênica sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \hat{H}_{max} : máxima diversidade para cada loco; $\hat{H}_e / \hat{H}_{max}$: proporção da diversidade máxima (em %)

Locos	N	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_o	\hat{H}_e	\hat{H}_{max}	$\hat{H}_e / \hat{H}_{max}$
Cg 01	954	10	1,531	0,327	0,347	0,900	38,55%
Cg 06	954	7	1,647	0,352	0,393	0,857	45,84%
Cg12	948	7	2,395	0,840	0,582	0,857	67,95%
Cg 16	953	14	5,970	0,764	0,832	0,929	89,65%
Cg 17	950	15	2,632	0,518	0,620	0,933	66,43%
Cg 05p	936	14	4,778	0,614	0,791	0,928	85,24%
Cg 07p	954	18	3,263	0,665	0,694	0,944	73,43%
Média	949,86	12,14	2,554	0,583	0,608	0,968	66,73%

Tabela 4 – Frequência de alelos nulos pelo método de estimação de Brookfield (1996) para três classes de tamanho de uma população de *Carapa guianensis*

Locos	Plântulas	Jovens	Adultos
Cg 01	0,015 ^{ns}	0,026 ^{ns}	-0,000 ^{ns}
Cg 06	0,017 ^{ns}	0,051 ^{ns}	0,018 ^{ns}
Cg 12	-0,183 ^{ns}	-0,130 ^{ns}	-0,162 ^{ns}
Cg 16	0,049 ^{ns}	0,024 ^{ns}	0,027 ^{ns}
Cg 17	0,073	0,031 ^{ns}	0,074 ^{ns}
Cg 05p	0,116	0,091	0,072
Cg 07p	0,015 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,029 ^{ns}

^(ns) valores não significativos a 5% de probabilidade.

A associação entre locos foi avaliada pelo teste do desequilíbrio genotípico entre pares de locos, utilizando-se as frequências genotípicas. Na Tabela 6, observa-se associação significativa a 5% em 33,3% dos locos nas plântulas, 4,76% nos jovens e 14,28% nos adultos. Observa-se também que os locos Cg 17 e Cg 12 provavelmente se encontram ligados nesta população, uma vez que a associação entre eles foi significativa para as três classes de tamanho estudadas.

Tabela 5 – Probabilidades do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, para cada loco de SSR em *Carapa guianensis*

Locos SSR	Plântulas	Jovens	Adultos
Cg 01	0,000	0,000	0,022
Cg 06	0,192 ^{ns}	0,000	0,001
Cg12	0,000	0,000	0,000
Cg 16	0,000	0,000	0,000
Cg 17	0,000	0,001	0,000
Cg 05p	0,000	0,000	0,000
Cg07p	0,325 ^{ns}	0,187 ^{ns}	0,000

^(ns) valores não significativos a 5% de probabilidade.

3.2.2.2 Variabilidade genética

Com relação à diversidade genética intrapopulacional, verifica-se que no ambiente de terra firme o número médio de alelos por loco nas plântulas ($\hat{A} = 8,43$) foi ligeiramente superior ao observado nas classes de jovens ($\hat{A} = 6,71$) e adultos ($\hat{A} = 6,29$) (Tabela 7). Observa-se, entretanto, que o número médio de indivíduos analisados nessas três classes foi diferente, sendo que as plântulas ($N = 213,86$) apresentaram aproximadamente o dobro de indivíduos do que os jovens ($N = 114,71$) e adultos ($N = 88,71$). A diferença amostral pode ter influenciado no número de alelos amostrados.

Já para o ambiente de baixio, o número médio de alelos por loco nas plântulas ($\hat{A} = 6,71$) foi ligeiramente inferior ao observado nas classes de jovens ($\hat{A} = 7,57$) e adultos ($\hat{A} = 8,14$), embora o número amostral também tenha sido superior ($N = 231,71$ plântulas; $N = 133,28$ jovens e $167,57$ adultos).

Tabela 6 – Probabilidades do desequilíbrio genotípico entre pares de locos de SSR em *Carapa guianensis*

Locos SSR	Plântulas	Jovens	Adultos
Cg01/Cg06	0,320 ^{ns}	0,182 ^{ns}	0,738 ^{ns}
Cg01/Cg12	0,013	0,125 ^{ns}	0,000 ^{ns}
Cg01/Cg16	0,361 ^{ns}	0,980 ^{ns}	0,159 ^{ns}
Cg01/Cg17	0,000	0,823 ^{ns}	0,271 ^{ns}
Cg01/Cg05p	0,646 ^{ns}	0,163 ^{ns}	0,888 ^{ns}
Cg01/Cg07p	0,298 ^{ns}	0,573 ^{ns}	0,854 ^{ns}
Cg06/Cg12	0,250 ^{ns}	0,678 ^{ns}	0,323 ^{ns}
Cg06/Cg16	0,088 ^{ns}	0,525 ^{ns}	0,371 ^{ns}
Cg06/Cg17	0,044	0,259 ^{ns}	0,255 ^{ns}
Cg06/Cg05p	0,008	0,490 ^{ns}	0,616 ^{ns}
Cg06/Cg07p	0,531 ^{ns}	0,511 ^{ns}	0,059 ^{ns}
Cg12/Cg16	0,316 ^{ns}	0,838 ^{ns}	0,201 ^{ns}
Cg12/Cg17	0,000	0,021	0,000
Cg12/Cg05p	0,950 ^{ns}	0,491 ^{ns}	0,250 ^{ns}
Cg12/Cg07p	0,066 ^{ns}	0,980 ^{ns}	0,614 ^{ns}
Cg16/Cg17	0,003	0,578 ^{ns}	0,007
Cg16/Cg05p	0,307 ^{ns}	0,160 ^{ns}	0,083 ^{ns}
Cg16/Cg07p	0,003	0,342 ^{ns}	0,050 ^{ns}
Cg17/Cg05p	0,908 ^{ns}	0,625 ^{ns}	0,661 ^{ns}
Cg17/Cg07p	0,356 ^{ns}	0,600 ^{ns}	0,278 ^{ns}
Cg05p/Cg07p	0,244 ^{ns}	0,309 ^{ns}	0,195 ^{ns}

^(ns) valores não significativos a 5% de probabilidade.

Observando a população sem diferenciar os ambientes, verifica-se que as plântulas apresentaram um número médio de alelos por loco ($\hat{A} = 9,14$) muito próximo dos jovens ($\hat{A} = 8,86$) e adultos ($\hat{A} = 9,28$), mas com número de indivíduos ligeiramente superior às outras duas classes de tamanho. O número efetivo de alelos observado para as três classes de tamanho nos dois ambientes e na população total (Tabela 7), foi

inferior ao número médio de alelos, fato este que já tinha sido evidenciado na análise individual dos locos (Tabela 3).

Os valores \hat{H}_e para plântulas, jovens e adultos na terra firme (0,609, 0,607 e 0,612, respectivamente) foram ligeiramente superiores aos observados no ambiente de baixo ($\hat{H}_e = 0,591$ para plântulas e jovens e 0,607 para adultos) (Tabela 7). Nos dois ambientes os adultos apresentaram índices médios de diversidade gênica ligeiramente superiores às outras duas classes, mas observa-se que os erros-padrão se sobrepõem, mostrando que a diferença não foi significativa. Ao observar a população total, verifica-se que este fato também está ocorrendo.

Nos dois ambientes, as estimativas médias de diversidade gênica (\hat{H}_e) foram superiores às estimativas médias de heterozigosidade observada (\hat{H}_o) para as três classes de tamanho (Tabela 7). As estimativas médias de \hat{H}_o foram menores para as plântulas e maiores para os adultos nos dois ambientes e na população total, e da mesma forma que as estimativas de \hat{H}_e , os erros-padrão se sobrepõem mostrando que a diferença não é significativa.

Alelos exclusivos foram observados para cada classe de tamanho e para cada ambiente (Figura 4). No ambiente de terra firme, as plântulas apresentaram número superior de alelos exclusivos (14) em comparação aos jovens (três) e adultos (três). No ambiente de baixo, por outro lado, verifica-se que os jovens (oito) e adultos (sete) apresentam número superior de alelos exclusivos em relação às plântulas (quatro). A maioria dos alelos exclusivos ocorre em baixíssima frequência (Tabela 8), sendo que muitos foram observados somente uma vez. Nesse caso, o fato do alelo ser exclusivo a uma classe foi decorrente de ter ocorrido apenas uma vez.

Tabela 7 – Estimativas de índices de diversidade genética obtidas em *Carapa guianensis* nos ambientes de terra firme, baixo e em ambos os ambientes. Em que N: número médio de indivíduos analisados; \hat{A} : número médio de alelos por loco; \hat{A}_e : número efetivo de alelos por loco; \hat{H}_o : heterozigosidade observada e \hat{H}_e : diversidade gênica sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Terra Firme	N	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_o	\hat{H}_e
Plântulas	213,86	8,43 (1,195)	2,56 (1,057)	0,572 (0,056)	0,609 (0,054)
Jovens	114,71	6,71 (0,625)	2,54 (1,055)	0,576 (0,049)	0,607 (0,052)
Adultos	88,71	6,29 (0,625)	2,58 (1,053)	0,598 (0,048)	0,612 (0,051)
Baixo	N	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_o	\hat{H}_e
Plântulas	231,71	6,71 (0,961)	2,44 (1,069)	0,571 (0,071)	0,591 (0,065)
Jovens	133,28	7,57 (1,222)	2,44 (1,078)	0,588 (0,082)	0,591 (0,072)
Adultos	167,57	8,14 (1,222)	2,54 (1,073)	0,599 (0,076)	0,607 (0,068)
Total	N	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_o	\hat{H}_e
Plântulas	445,57	9,14 (1,359)	2,52 (1,064)	0,574 (0,061)	0,603 (0,060)
Jovens	248	8,86 (0,921)	2,54 (1,062)	0,582 (0,064)	0,607 (0,059)
Adultos	256,28	9,28 (0,961)	2,60 (1,063)	0,599 (0,063)	0,616 (0,059)

Nota: () erros-padrão.

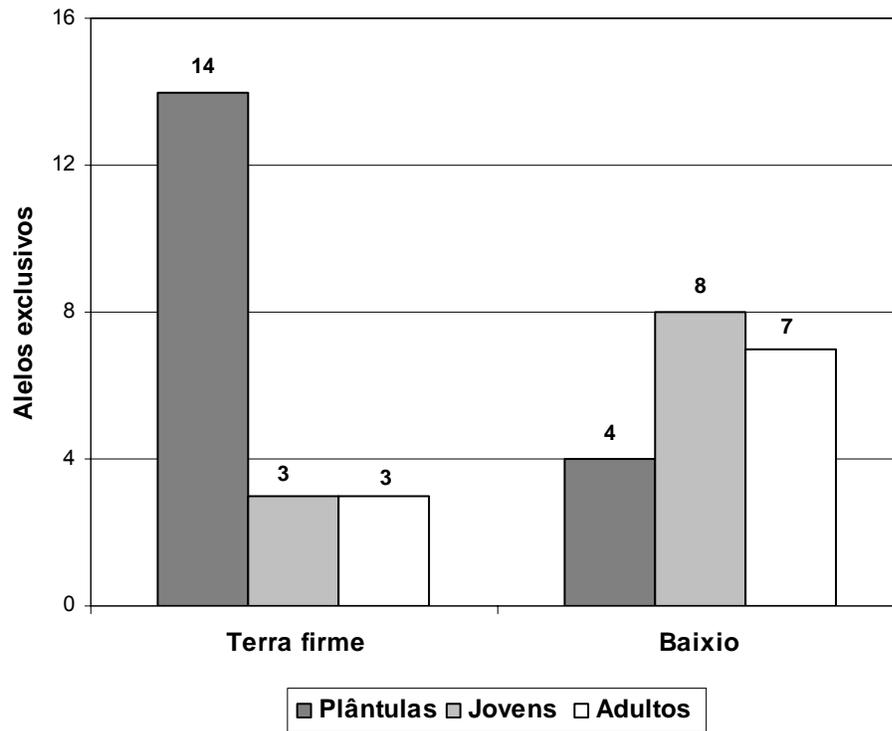


Figura 4 – Número de alelos exclusivos para plântulas, jovens e adultos e para os ambientes de terra firme e baixo, em um total de 85 alelos de microssatélites encontrados na população avaliada de *Carapa guianensis*

As estimativas médias do índice de fixação (\hat{f}) apresentaram valores baixos e positivos (Tabela 9) para as três classes de tamanho (plântulas, jovens e adultos), nos dois ambientes (terra firme e baixo) e para a população total. Todas as estimativas médias de \hat{f} não foram significativamente diferentes de zero, indicando ausência de endogamia na população. Os intervalos de confiança foram amplos devido à variação existente entre os locos. Os locos Cg 12 e Cg 05p foram os que apresentaram valores mais acentuados, respectivamente, para excesso e falta de heterozigotos. Para verificar a influência desses valores na estimativa média de \hat{f} nos ambientes e na população como um todo, estimou-se novamente esse parâmetro com a exclusão dos locos Cg 12 e Cg 05p. Mesmo com a exclusão desses dois locos, as estimativas médias de \hat{f} continuaram não significativas.

Tabela 8 – Freqüência de alelos exclusivos por loco, na população avaliada de *Carapa guianensis*

(conclusão)

Terra Firme				Baixio				Total			
Locos	P	J	A	Locos	P	J	A	Locos	P	J	A
Cg07p				Cg07p				Cg07p			
198	0,002	-	-	214	-	0,004	-	198	0,001	-	-
204	0,002	-	-	228	-	-	0,006	204	0,001	-	-
228	0,002	-	-	238	-	0,004	-	238	-	0,002	-
252	0,002	-	-	254	0,002	-	-	252	0,001	-	-
								254	0,001	-	-

Nota: P = Plântulas; J = Jovens e A = Adultos

Valores elevados de \hat{N}_e e da relação \hat{N}_e/N foram observados em ambos os ambientes e na população total (Tabela 10). A representatividade genética (\hat{N}_e/N) das amostras foi superior a 95% em todas as classes de tamanho, chegando a 99% nos jovens e adultos do ambiente de baixio. Esses resultados foram decorrentes da ausência de endogamia na população. A taxa de cruzamento aparente, a qual é calculada a partir da estimativa de \hat{f} , foi próxima de 100% tanto para os ambientes como para a população total. Os valores estão congruentes com os outros parâmetros intrapopulacionais, indicando que esta espécie apresenta alta taxa de cruzamento.

Considerando-se a população total, não foi observada divergência genética entre as classes de tamanho, já que o $\hat{\theta}_p$ não diferiu de zero nas comparações entre pares de classes de tamanho (Tabela 11). Isso já era esperado, pois, conforme já comentado, não foi observada variação marcante nas freqüências alélicas entre as mesmas. A estimativa de divergência genética ($\hat{\theta}_p$) entre os indivíduos do ambiente de terra firme e os do baixio foi baixa (0,016), mas significativa, sendo que a maior parte da variabilidade genética (98,37%) está concentrada dentro dos ambientes (Tabela 11). O fluxo gênico aparente entre estes ambientes foi elevado (15,09 migrantes por geração).

Tabela 9 – Estimativas de índices de fixação (\hat{f}) por loco para plântulas (P), jovens (J) e adultos (A) de *Carapa guianensis*, nos ambientes de terra firme e baixo e na população total

Locos	Terra Firme			Baixo			Total		
	P	J	A	P	J	A	P	J	A
Cg 01	0,098	0,062	-0,194	-0,002	0,054	0,117	0,057	0,108	0,000
Cg 06	0,076	0,149	0,046	0,064	0,184	0,046	0,069	0,175	0,060
Cg12	-0,357	-0,078	-0,168	-0,668	-0,697	-0,647	-0,512	-0,343	-0,432
Cg 16	0,126	0,083	0,037	0,073	0,027	0,059	0,111	0,055	0,063
Cg 17	0,151	-0,105	0,116	0,218	0,202	0,238	0,187	0,084	0,199
Cg 05p	0,196	0,216	0,201	0,313	0,193	0,138	0,264	0,209	0,164
Cg 07p	0,059	0,013	0,048	0,009	-0,006	0,065	0,037	0,019	0,072
Média	0,060	0,051	0,024	0,027	0,005	0,012	0,048	0,041	0,028
Limite superior	0,163	0,152	0,140	0,242	0,187	0,169	0,209	0,169	0,158
Limite inferior	-0,157	-0,058	-0,119	-0,329	-0,350	-0,317	-0,240	-0,169	-0,214

Nota: ICC - intervalo de confiança a 99% de probabilidade, usando 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre os locos.

Tabela 10 – Estimativa média de índice de fixação (\hat{f}), tamanho populacional (\hat{N}_e), relação entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral (\hat{N}_e/N) e taxa de cruzamento aparente (\hat{t}_a) para plântulas, jovens e adultos de *Carapa guianensis*, nos ambientes de terra firme e baixo e na população total

Ambiente de terra firme					
Classes de tamanho	N	\hat{f} (ICC 99%)	\hat{N}_e	\hat{N}_e/N	\hat{t}_a
Plântulas	213,86	0,060 (- 0,157 a 0,163)	201,75	0,94	
Jovens	114,71	0,051 (- 0,058 a 0,152)	109,14	0,95	0,90
Adultos	88,71	0,024 (- 0,119 a 0,140)	86,63	0,98	0,95
Ambiente de baixo					
Classes de tamanho	N	\hat{f} (ICC 99%)	\hat{N}_e	\hat{N}_e/N	\hat{t}_a
Plântulas	231,71	0,027 (- 0,329 a 0,242)	225,62	0,97	
Jovens	133,28	0,005 (- 0,350 a 0,187)	132,62	0,99	0,99
Adultos	167,57	0,012 (-0,317 a 0,169)	165,58	0,99	0,98
População total					
Classes de tamanho	N	\hat{f} (ICC 99%)	\hat{N}_e	\hat{N}_e/N	\hat{t}_a
Plântulas	445,57	0,048 (- 0,240 a 0,209)	425,16	0,95	
Jovens	248,00	0,041 (- 0,169 a 0,169)	238,23	0,96	0,92
Adultos	256,28	0,028 (- 0,214 a 0,158)	249,30	0,97	0,94

Nota: ICC - intervalo de confiança a 99% de probabilidade, usando 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre os locos.

3.2.3 Discussão

Este é um trabalho pioneiro, já que estuda um número grande de indivíduos de uma única população de *C. guianensis* divididos em três classes de tamanho e em dois ambientes distintos. O conhecimento da distribuição da variabilidade genética em diferentes grupos de indivíduos em uma mesma população, assim como do ambiente onde ela ocorre em maior densidade, permite o entendimento da manutenção da

variabilidade entre as gerações, possibilitando recomendações para tomada de decisões em planos de manejo sustentável e também para conservação “in situ” das espécies.

Tabela 11 – Estimativas de índices divergência genética ($\hat{\theta}_p$) entre os indivíduos dos ambientes de terra firme e baixo e entre as três classes de tamanho e fluxo gênico aparente (Nm) entre estes ambientes, para uma população de *Carapa guianensis*. IC_{99%}: Intervalo de confiança de 99% de probabilidade obtida por 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos

	$\hat{\theta}_p$ IC _{99%}	Nm
Terra firme X Baixo	0,016 (0,009 a 0,027)	15,09
Plântulas X Jovens	0,002 (-0,002 a 0,005)	
Plântulas X Adultos	0,003 (0,000 a 0,011)	
Jovens X Adultos	0,000 (-0,001 a 0,000)	

Na população estudada existe praticamente quase a mesma quantidade de jovens e adultos, mas quando se observa separadamente cada ambiente, verifica-se que o baixo apresenta maior número de indivíduos e também maior densidade de adultos quando comparado com o ambiente de terra firme. Estes dados corroboram com vários autores que indicam que esta espécie predomina nas regiões periodicamente alagadas da floresta (BOUFLEUR, 2004; KLIMAS, 2006; LEITE, 1997) apesar de se desenvolver bem em locais de terra firme. Klimas (2006), em estudos de ecologia na mesma área de estudo do presente trabalho, encontrou 25,5 e 14,5 indivíduos de *C. guianensis* com diâmetro à altura do peito (DAP) acima de 10 cm respectivamente em ambiente de baixo e terra firme.

3.2.3.1 Caracterização dos locos

Observou-se um alto nível de polimorfismo em todos os sete locos estudados (Anexo – Tabela 1), confirmando o alto conteúdo de informação genética para estudos populacionais, o que já era esperado devido ao tipo de marcador utilizado. Observou-se pequena variação nas frequências alélicas entre as três classes de tamanho, tanto na

população total quanto nos dois ambientes. Apesar de pequena, a variação nas freqüências alélicas pode estar ocorrendo devido a vários fatores evolucionários, tais como: migração, seleção, mutação, deriva genética, sucesso reprodutivo diferenciado (FUTUYMA, 1992). A amostragem das plântulas também pode ter causado essa variação.

Eguiarte, Perez-Nasser e Piñero (1992) concluíram que diferenças nas freqüências alélicas encontradas entre sementes e adultos de *Astrocaryum mexicanum*, indicam a entrada de novos alelos a partir da migração de pólen de áreas diferentes das amostradas. Kawaguici e Kageyama (2001), estudando a diversidade genética em adultos, jovens e plântulas de *Calophyllum brasiliense*, uma espécie arbórea comum em florestas pluviais, verificaram também a ocorrência de oscilações nas freqüências alélicas entre os grupos de indivíduos de uma única população. Estes autores concluíram que os dados genéticos obtidos não permitem inferir se os desvios são devidos ao sistema reprodutivo ou a fatores evolutivos.

Pode-se sugerir a ação da deriva genética para explicar as variações das freqüências alélicas, principalmente entre as plântulas e os adultos. A andiroba possui floração assincrônica e observa-se que nem todos os indivíduos adultos se reproduzem ao mesmo tempo (BOUFLEUER, 2004), portanto, uma parte desta variação pode estar ocorrendo pelo sucesso reprodutivo diferenciado, e também por fatores ambientais próprios da floresta tais como os processos casuais de morte de indivíduos. Mas também se deve levar em consideração a migração de pólen vindo de fora da área amostrada, já que possibilita a entrada de novos alelos na população.

Outro fator que pode ter contribuído para as variações nas freqüências alélicas foi a estratégia diferenciada de amostragem de plântulas em relação aos jovens e adultos, já que não foram coletadas todas as plântulas existentes na população.

No total de 949,86 indivíduos, em média, avaliados, o número médio de alelos por loco (\hat{A}) foi de 12,14 e a diversidade gênica média (\hat{H}_e) de 0,608, o que corrobora com outros estudos com esta espécie. Dayanandan et al. (1999), estudando três populações de *C. guianensis* na Costa Rica, com três locos SSR, encontraram valores semelhantes de diversidade gênica ($\hat{H}_e = 0,64$), apesar do número médio de alelos por loco ter sido inferior ($\hat{A} = 8,17$). Kageyama et al. (2004), avaliaram duas populações de

andiroba em Porto Acre, no Acre, com apenas dois locos SSR e encontraram uma diversidade gênica maior ($\hat{H}_e = 0,74$), e número médio de alelos por loco ligeiramente inferior ($\hat{A} = 7,87$). Resultados semelhantes a estes também foram obtidos por Cloutier et al. (2007) ($\hat{H}_e = 0,71$ e $\hat{A} = 7,87$), em uma população de andiroba na Floresta Nacional do Tapajós, no Pará. Nesse mesmo estudo, que visou avaliar os efeitos do manejo florestal, os autores verificaram valores de diversidade gênica elevados e menor número médio de alelos para sementes que foram coletadas tanto antes ($\hat{H}_e = 0,69$ e $\hat{A} = 7,7$) como depois da exploração florestal ($\hat{H}_e = 0,70$ e $\hat{A} = 7,6$).

A diversidade máxima (\hat{H}_{\max}) representa o valor máximo teoricamente esperado da diversidade gênica de acordo com o número observado de alelos. No presente estudo, a máxima diversidade (\hat{H}_{\max}) foi calculada em 0,968. Como a diversidade gênica foi estimada em $\hat{H}_e = 0,608$, os marcadores SSR utilizados neste estudo detectaram cerca de 66,73% da diversidade máxima possível. A Tabela 12 sintetiza as estimativas de alguns parâmetros genéticos obtidos no presente trabalho e por outros autores para a espécie *C. guianensis* e outras espécies arbóreas que ocorrem na região amazônica. Os parâmetros (\hat{H}_{\max}) e \hat{H}_e/\hat{H}_{\max} foram calculados com base nos dados contidos nos artigos.

Teoricamente, a diversidade gênica (\hat{H}_e) em um loco atinge a máxima diversidade possível quando os alelos observados ocorrem em frequências iguais. Em locos com grande número de alelos como os SSR têm-se observado que a diversidade gênica é também elevada. Porém, considerando como os parâmetros \hat{H}_e e \hat{H}_{\max} são calculados, constata-se que a ocorrência de muitos alelos raros em uma população ocasiona um aumento proporcionalmente maior na estimativa de \hat{H}_{\max} (que considera apenas o número observado de alelos) em comparação a \hat{H}_e (que considera frequências alélicas).

Tabela 12 – Estimativas de N : número de indivíduos analisados; \hat{A} : número médio de alelos por loco; \hat{H}_e : heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \hat{H}_{\max} : máxima diversidade para cada loco e \hat{H}_e/\hat{H}_{\max} : proporção da diversidade máxima (em %)

Autor	Espécie	Local	N. de locos SSR	N	\hat{A}	\hat{H}_e	\hat{H}_{\max}	\hat{H}_e/\hat{H}_m
O presente trabalho	<i>Carapa guianensis</i>	Rio Branco - AC	7	957	12,14	0,608	0,968	66,73
Aldrich et al. (1998)	<i>Symphonia globulifera</i>	Costa Rica	3	914	18,33	0,830	0,945	87,83
Cloutier et al. (2007)	<i>Carapa guianensis</i>	Flona Tapajós – PA (população total)	6	365	7,87	0,710	0,873	81,30
Cloutier et al. (2007)	<i>Carapa guianensis</i> (sementes)	Flona Tapajós – PA (antes da exploração)	6	390	7,7	0,690	0,870	79,30
Cloutier et al. (2007)	<i>Carapa guianensis</i> (sementes)	Flona Tapajós – PA (depois da exploração)	6	391	7,6	0,700	0,868	80,60
Dayanandan et al. (1999)	<i>Carapa guianensis</i>	Costa Rica	3	170	8,17	0,640	0,878	72,80
Kageyama et al. (2004)	<i>Carapa guianensis</i>	Porto Acre - AC	2	133	7,87	0,740	0,873	84,80
Lemes et al. (2003)	<i>Swietenia macrophylla</i>	Amazônia brasileira	8	152	18,40	0,851	0,945	90,00
Novick et al. (2003)	<i>Swietenia macrophylla</i>	América Central	7	287	13,00	0,657	0,923	71,18

Como no presente estudo realizou-se uma amostragem muito grande em uma população, foi possível detectar grande quantidade de alelos raros. Isso explica porque, embora se tenha detectado maior número médio de alelos em comparação aos outros estudos com populações de andiroba e outras espécies arbóreas (Tabela 12), a \hat{H}_e alcançou apenas 66,26% da máxima diversidade.

As estimativas do número efetivo de alelos por loco (\hat{A}_e) foram sempre inferiores ao número de alelos por loco (\hat{A}) em todos os sete locos estudados. Essa tendência de menor estimativa de \hat{A}_e em comparação ao \hat{A} tem sido observada em estudos realizados com marcadores SSR, tanto em populações de andiroba (CLOUTIER et al., 2007; DAYANANDAN et al., 1999; KAGEYAMA et al., 2004) como de outras espécies arbóreas (CASTELLEN, 2005; MARTINS et al., 2006). O elevado polimorfismo observado em locos microssatélites, decorrente de taxas elevadas de mutação, resulta na presença de alelos que ocorrem em baixa frequência na população. É justamente a distribuição desigual nas frequências alélicas, já observada anteriormente, que ocasiona a diferença entre as estimativas de \hat{A}_e e \hat{A} .

Estes dados são similares a outros estudos realizados com o uso de marcadores SSR em populações naturais de espécies arbóreas (CASTELLEN, 2005; MARTINS et al., 2006) e em populações de andiroba (CLOUTIER et al., 2007; DAYANANDAN et al., 1999; KAGEYAMA et al., 2004), indicando que ocorre uma distribuição desigual nas frequências alélicas, e que muitos alelos ocorrem em baixa frequência. Se por algum motivo ocorrerem mudanças ambientais que promovam processos de gargalos ou deriva genética, estes alelos em baixa frequência serão os mais prováveis de serem perdidos.

Na população estudada verificou-se significância estatística para a presença de alelos nulos para as plântulas do loco Cg 17 e para as três classes de tamanho do loco Cg 05p (Tabela 4). Entretanto, este resultado deve ser interpretado com cautela. Provavelmente, no loco Cg 17 esta significância deve estar relacionada à presença de “stutters”, onde a ocorrência de bandas muito próximas promovem o “mascaramento” do heterozigoto, já que somente as plântulas apresentaram resultados significativos. No

loco Cg 05p, pela significância ter ocorrido nas três classes de tamanho, pode-se dizer que há fortes indícios para a presença de alelos nulos nesse loco.

O loco Cg 05p foi desenvolvido por Dayanandan et al. (1999) que o utilizou em estudos populacionais na Costa Rica. Em estudos realizados em populações do município de Porto Acre (KAGEYAMA et al., 2004) e da Floresta Nacional do Tapajós (CLOUTIER et al., 2007), este loco não apresentou indícios de alelos nulos. Uma provável explicação para a presença de alelo nulo neste loco é que pode ter ocorrido uma mutação no local de hibridação do iniciador, nesta população.

Em EHW a frequência relativa dos alelos deve permanecer a mesma de uma geração para a outra, sendo a única mudança possível na composição genética da população a redistribuição dos alelos dentro dos genótipos na nova geração (FUTUYMA, 1992). Considerando que uma população está em EHW, é possível estimar as frequências genotípicas a partir das frequências alélicas e vice-versa. Dessa maneira, testa-se se as frequências genotípicas observadas em uma população natural são próximas às frequências esperadas pelo EHW. Esse procedimento é usualmente denominado teste do EHW e tem por objetivo medir os desvios nas proporções esperadas de EHW (WEIR, 1996). Esses desvios do EHW podem ser causados por fatores evolutivos como seleção, migração, mutação e deriva genética, pelo sistema de reprodução a partir de autofecundações e cruzamento entre parentes, efeito de Wahlund (HARTL; CLARK, 1997) e a presença de alelos nulos (BROOKFIELD, 1996).

No presente estudo verificou-se que a maioria dos locos não está nas proporções esperadas para o EHW. Observando a Tabela 3 verifica-se que, em média, os locos apresentaram um número menor de heterozigotos do que o esperado sob as pressuposições do EHW, indicando provavelmente que os desvios foram causados pelo sistema de reprodução e/ou efeito Wahlund e também pela presença de alelos nulos.

Verificou-se a possibilidade de ligação entre os locos Cg 17 e Cg 12 para esta população. Vale ressaltar que o conhecimento prévio da independência na segregação dos alelos de diferentes locos é uma das pressuposições básicas para o estudo do sistema reprodutivo (RITLAND; JAIN, 1981). Portanto, para estudos do sistema reprodutivo nesta espécie, se faz necessária a avaliação da associação entre locos em

outras populações, principalmente entre os locos Cg 17 e Cg 12 que apresentaram associação positiva neste estudo.

3.2.3.2 Variabilidade genética

Os valores estimados de riqueza alélica e a diversidade gênica nos dois ambientes e na população total mostram que a população estudada apresenta alta variabilidade genética. Esses dados indicam que as próximas gerações poderão apresentar novos recombinantes que possibilitarão a manutenção da variabilidade genética existente nesta população.

Verificou-se a existência de alelos exclusivos em cada uma das três classes de tamanho, na população total e nos dois ambientes. A maioria destes alelos ocorreu em freqüências muito baixas, indicando que para a maioria deles o fato de serem exclusivos foi decorrente da raridade, já que foram observados apenas uma vez na população e que, provavelmente, não interferiram nos parâmetros genéticos estudados.

A classe de plântulas do ambiente de terra firme foi a que apresentou maior número de alelos exclusivos (Figura 7). Esse resultado pode estar relacionado ao fluxo de pólen oriundo de árvores adjacentes à parcela amostrada, à diferença no sucesso reprodutivo das árvores e ao modo da dispersão das sementes neste ambiente.

O fato de que nem todas as árvores da população florescerem a cada ano faz com que, temporariamente, sejam detectados alelos nas plântulas que não foram detectados nos adultos da mesma área, uma vez que nem todas as árvores contribuem com sementes para as gerações seguintes. A dispersão das sementes no ambiente de terra firme ocorre primeiramente por ação da gravidade (barocoria) e secundariamente por zoocoria. Já no baixio, além destes dois tipos de dispersão, tem-se também a hidrocoria (BOUFLEUR, 2004).

As sementes de andiroba são grandes e muito apreciadas por diversos mamíferos de pequeno porte, tais como: tatus, porcos-do-mato, pacas, cotias, dentre outros, que a utilizam como fonte de alimento. No ambiente de terra firme estes animais levam as sementes a distâncias não muito longas e, portanto, a amostragem das plântulas neste ambiente ficou restrita a sementes oriundas desta área. Devem-se considerar também os efeitos da seleção e da deriva genética, devido ao fato de nem

todas as sementes geradas conseguirem se estabelecer nesse ambiente e dar origem a jovens e adultos, ocasionando a perda de alguns alelos detectados nas classes de maior tamanho.

No ambiente de baixio, por outro lado, os adultos e jovens apresentaram maior número de alelos exclusivos que as plântulas. Uma provável explicação para este fato deve estar na dispersão das sementes por hidrocoria. Isso porque as sementes de andiroba são flutuantes e geralmente são carregadas pela água das chuvas e levadas pela correnteza dos igarapés. Isso faz com que sementes geradas por diferentes árvores maternas presentes tanto na região de baixio como em áreas mais elevadas se misturem e, como consequência, as sementes que vão se estabelecer neste ambiente provavelmente são vindas de diversas áreas.

Pode-se inferir que o modo predominante de dispersão de sementes nos dois tipos de ambiente e o efeito da amostragem restrita sob a copa de árvores maternas resultou em maior presença de alelos exclusivos nas plântulas coletadas na terra firme.

As estimativas de diversidade gênica (\hat{H}_e) para as três classes de tamanho nos dois ambientes e na população total foram superiores a heterozigosidade observada (\hat{H}_o), porém estes valores não foram estatisticamente diferentes entre si, a julgar pelo erro padrão.

Muitos estudos têm demonstrado que espécies arbóreas geralmente apresentam valores elevados de diversidade gênica (ALDRICH et al., 1998; CONTE et al., 2003; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; KAGEYAMA et al., 2004; KAWAGUICI; KAGEYAMA, 2001; LEMES et al., 2003; LEPSCH-CUNHA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999; NOVICK et al., 2003). Estas espécies apresentam, na maioria das vezes, características ecológicas tais como: eficiente dispersão de pólen e sementes, mecanismos que impedem a autofecundação, bons índices de regeneração e sobrevivência, dentre outras, que permitem a entrada de novos alelos na população, a cada geração. Com isso, ocorre o aumento na capacidade de adaptação da espécie às possíveis mudanças ambientais.

Vários autores têm observado a seleção favorecendo indivíduos heterozigóticos em várias espécies arbóreas (DOLIGEZ; JOLY, 1997; EGUIARTE; PEREZ-NASSER; PIÑERO, 1992; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; LEPSCH-CUNHA;

KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999; RIBAS; KAGEYAMA, 2004; SEBBEN et al., 2000), em que se observa a tendência do aumento da heterozigosidade observada dos descendentes para os adultos, ou seja, os descendentes da população apresentam maior taxa de endogamia em relação aos adultos.

Neste estudo verificou-se nos dois ambientes e na população total um ligeiro aumento da heterozigosidade observada dos adultos em relação às plântulas e, conseqüentemente, maiores valores estimados de \hat{f} para as plântulas, mas este não foi significativo. Os dados aqui apresentados corroboram com Cloutier et al. (2007) e Dayanandan et al. (1999), que também verificaram ausência de endogamia entre plântulas e adultos nesta mesma espécie. Segundo MAUÉS (2006), a andiroba apresenta auto-incompatibilidade esporófitica, em que o grão de pólen não consegue germinar no pistilo. Cloutier et al. (2007) comentam que esta incompatibilidade pré-zigótica deve ser a provável responsável pelo baixo nível de endogamia encontrado na população de andiroba que estudaram no Pará.

Como o índice de fixação foi praticamente nulo, as estimativas de tamanho efetivo populacional foram parecidas com o número de indivíduos coletados, fato que indica alta taxa de cruzamento nesta espécie, o que já era esperado já que ela é auto-incompatível.

Apesar de significativa, a divergência genética ($\hat{\theta}_p$) entre os ambientes de terra firme e baixio foi baixa (1,63%), indicando que a maior parte da variabilidade genética está concentrada dentro dos ambientes. Tal resultado é compatível com estudos realizados com populações de espécies arbóreas (ALDRICH et al., 1998; CÉSPEDES et al., 2003; CONTE et al., 2003; DAYANANDAN et al., 1999; HALL; ORREL; BAWA, 1994; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; KAGEYAMA et al., 2004; LEMES et al., 2003; LEPSCH-CUNHA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999). O fluxo gênico aparente (N_m) entre estes ambientes foi elevado (15,09 migrantes por geração), fato que já era esperado, visto que os dois fazem parte da mesma população e são muito próximos. Segundo Hall; Chase e Bawa (1994) os valores estimados de N_m diminuem à medida que a distância entre as populações vai aumentando.

3.3 Conclusões

O presente trabalho permitiu concluir que:

1. A população estudada apresenta praticamente o mesmo número de indivíduos jovens e adultos.

2. No ambiente de baixo encontra-se maior densidade de indivíduos adultos do que jovens. Já na terra firme ocorre o contrário, ou seja, existem mais indivíduos jovens do que adultos.

3. A diversidade gênica foi similar nas três classes de tamanho estudadas, na população total e nos dois ambientes.

4. A estimativa da taxa de cruzamento aparente foi alta, indicando que a espécie se reproduz preferencialmente por alogamia.

5. A população não se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

6. O número de migrantes por geração entre os ambientes é extremamente alto.

7. O fluxo gênico via sementes ocorre em maior intensidade no ambiente de baixo devido à dispersão pela água.

8. Ocorre baixa divergência genética entre os ambientes, indicando que a maior parte da variabilidade genética está concentrada dentro dos ambientes.

9. A andiroba é uma espécie promissora para ser utilizada em planos de manejo sustentável.

Referências

ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J. L.; CHAVARRIAGA, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 8, p. 933-944, Aug. 1998.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Genescan 3.7**. Califórnia, 2001. 1 CD-ROM.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Genotyper 2.0**. Califórnia, 1996. 1 CD-ROM.

ARAÚJO, H.J. de. **Agrupamento das espécies madeireiras ocorrentes em pequenas áreas sob manejo florestal do projeto de colonização Pedro Peixoto (AC) por similaridade das propriedades físicas e mecânicas.** 2002. 168p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BOUFLEUR, N. **Aspectos ecológicos de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet., Meliaceae), como subsídio ao manejo e conservação.** 2004. 67p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2004.

BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. A simple and cost effective method to synthesize a fluorescent labeled internal DNA standard for fragment sizing in an automatic sequencer. **Biotechniques**, Natick, v. 31, n. 4, p. 793-800, Oct. 2001.

BROOKFIELD, J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 453-455, June 1996.

CASTELLEN, M. S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Humanaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial.** 2005. 104p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CÉSPEDES, M.; GUTIERREZ, M.V.; HOLBROOK, N.; ROCHAS, O.J. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 12, p. 3201-3212, Dec. 2003.

CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 797-809, Feb. 2007.

CLOUTIER, D.; PÓVOA, J.S.R.; PROCÓPIO, L.C.; LEÃO, N.V.M.; WADT, L.H.O.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 54, n. 6, p. 270-274, Dec. 2005.

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from *F*-statistics. **Evolution**, Lancaster, v. 47, n. 3, p. 855-863, June 1993.

CONTE, R.; NODARI, R.O.; VENCOVSKY, R.; REIS, M.S. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, London, v. 91, n. 4, p. 401-406, Oct. 2003.

CROSSA, J.; VENCOVSKY, R. Implications of the variance effective size in the genetic conservation of monoecious species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 7-8, p. 936-942, Dec. 1994.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELE, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 1585-1592, Oct. 1999.

DOLIGEZ, A.; JOLY, H.I. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. **Heredity**, London, v. 79, n. 1, p. 72-82, July 1997.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n.1, p. 13-15, Jan. 1987.

DUKE, J. Phytochemical and ethnobotanical databases. (USDA/ARS). **Chemicals and their biological activities in: *Carapa guianensis* AUBL. (Meliaceae) – Andiroba.** Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl>>. Acesso em: 26 nov. 2004.

EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, L.; PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, London, v. 69, n. 2, p. 217-228, Feb. 1992.

FERRAZ, I.D.K., SAMPAIO, P.T.B. Métodos simples de armazenamento das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D.C. – Meliaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 26, n. 3, p. 137-144, jul. set. 1996.

FERRAZ, I.D.K., CAMARGO, J.L.C., SAMPAIO, P.T.B. Sementes e plântulas de andiroba (*C. guianensis* AUBL. e *C. procera* D.C.): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**, Manaus, v 32, n. 4, p. 661-647, out. dez. 2002.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: SBG, 1992. 631p.

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D; VENCOVSY,R. Genetic structure, mating system, and log-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, Washington, v. 94, n. 5, p. 399-406, Sept. 2003.

GOUDET, J. F_{SAT} version1,2: a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, Washington, v. 86, n. 6, p.485-486, Nov. 1995.

GOVERNO DO ESTADO DO ACRE. **O estado do Acre: Localização, área territorial e informações geográficas**. Disponível em: Disponível em: <<http://www.seiam.ac.gov.br>>. Acesso em: 10 out. 2006.

HALL, P.; CHASE, M.R.; BAWA, K. Low genetic variation but high population differentiation a common tropical forest tree species. **Conservation Biology**, Boston, v. 8, n. 2, p. 471-482, June 1994.

HALL, P.; ORREL, L.C.; BAWA, K. Genetic diversity and mating system in a tropical tree. *Carapa guianensis* (Meliaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 9, p. 1104-1111, Sept. 1994.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. 3 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997. 542 p.

JANKOWSKY, I.P.; CHIMELO, J.P.; CAVALCANTE, A.A.; GALINA, I.C.M.; NAGAMURA, J.C.S. **Madeiras brasileiras**. Caxias do Sul: Spectrum, 1990. v. 1, 172p.

KAGEYAMA, P.Y.; CARON, D.; GANDARA, F.B.; MARTINS, K.; WADT, L.H.O.; LACERDA, C.M.B.; BOUFLEUER, N.T.; RIBAS, L.A.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E.M. Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western Amazonian settlements. In: VINCETI, B.; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Orgs.). **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: IPGRI, 2004, p. 149-217.

KAWAGUICI, C.B.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v59, p. 131-143, jun. 2001.

KLIMAS, C. A. **Ecological review and demographic study of *Carapa guianensis***. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade da Florida, Florida-EUA, 2006.

LEITE, A. M. C. **Ecologia de *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) “Andiroba”**. 1997. 180p. Tese (Doutorado em Botânica). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, 1997.

LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 2875-2883, Nov. 2003.

LEPSCH-CUNHA, N. KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Genetic diversity of *Couratari multiflora* and *Couratari guianensis* (Lecythifaceae); consequences of two types of rarity in central Amazônia. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, n. 9, p. 1205-1218, Sept. 1999.

LESLIE, T. **The healing power of Rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinals**. New York: Square one Publishers, 2005. 535p.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer computer programe for the analyse of allelics data (software) 2002. version 1.0(d2). Disponível em: <<http://alleun.eeb.uconn.edu/gda>>. Acesso em: 20 nov. 2003.

LOUREIRO, A.A.; SILVA, M.F.; ALENCAR, J.C. **Essências madeireiras da Amazônia**. Manaus: INPA/SUFRAMA. 1979. v. 2, 245p.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 326p

MACHADO, F.R.B.; VINSON, C.C.; SILVA, V.P.; CIAMPI, A.Y. Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53., 2002, Recife. **Resumo...** Recife: SSB. 2002. p. 79-80. Resumo 0251.

MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 7, n. 6, p. 957-969, Dec. 2006.

MAUÉS, M.M. **Estratégias reprodutivas de espécies arbóreas e sua importância para o manejo e conservação florestal: Floresta Nacional de Tapajós (Belterra-PA)**. 206p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

NOVICK, R.R.; DICK, C.W.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CACCONI, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n.11, p.2885-2893, Nov. 2003.

OOSTERHOUT, C.V.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, n.3, p. 535-538, Sept. 2004.

RIBAS, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) considerando diferentes estádios de vida. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 65, p. 176-187, jun. 2004.

RITLAND, K.A.; JAIN, S. A model for estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, Oxford, v. 47, p. 35-52, Jan.1981

RIZZINI, T.C. **Plantas do Brasil: árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1971. 294p.

SEBBEN, A.M.; SEOSNE, C.E.S.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 58, p.127-143, dez. 2000.

VENCOVSKY, R. Variance of an estimative of the outcrossing rate. **Brazilian Journal of genetics**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 349-351, Sept. 1994.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 6, p. 1912-1921, Nov. Dec. 2003.

VIANNA, N. G. **Conservação de sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)**. Belém: EMBRAPA/CPATU, 1982. 10p.

VINSON, C.C.; AZEVEDO, V.C.R.; SAMPAIO, I; CIAMPI, A.Y. Development of microsattelite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v. 5, n. 1, p. 33-34, Mar. 2005.

WEIR, B.S. Inferences about linkage desiquilibrium. **Biometrics Bulletin**, Washington, v. 35, n. 1, p. 235-254, Mar. 1979.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates. 445p. 1996.

WHITE, G; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n.9, p.851-868, Sept. 1997.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, n.4, p. 323-354, July 1951.

4 ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL INTRAPOPULACIONAL E TESTE DE PATERNIDADE EM *Carapa guianensis* (AUBLET.) EM UMA REGIÃO NÃO EXPLORADA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

RESUMO

A importância do conhecimento da estrutura genética espacial está relacionada com o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais. Seu estudo, juntamente com a análise de paternidade, que é uma excelente ferramenta para a definição do fluxo de pólen, é muito útil para o estabelecimento de estratégias de manejo e conservação. Os objetivos do presente trabalho foram estudar a estrutura genética espacial de uma população de *Carapa guianensis*, localizada em uma área de Floresta Tropical Úmida no Estado do Acre, avaliando esta estrutura em dois ambientes distintos (terra firme e baixio) e em duas classes de tamanho (jovens e adultos) dentro destes ambientes, e estimar a distância máxima de fluxo gênico via pólen entre os ambientes. Foram utilizados sete locos microssatélites para analisar o parentesco genético entre os indivíduos ($n = 497$) desta população. A autocorrelação espacial foi utilizada para calcular a média do coeficiente de coancestria entre os indivíduos dentro de 10 intervalos de distância. Para as análises de paternidade foram utilizadas 217 sementes provenientes do ambiente de terra firme e 234 do baixio, que foram analisadas pelo programa Cervus 2.0. As análises de autocorrelação espacial dos genótipos revelaram que a população apresentou um padrão clinal de variação espacial, sendo que as árvores localizadas a uma distância de até aproximadamente 370 metros tenderam a ser geneticamente similares. No ambiente de baixio encontrou-se este mesmo padrão, onde árvores localizadas a uma distância de até 160 metros mostraram-se mais aparentadas entre si, do que árvores mais distantes. Quando se observou separadamente cada classe de tamanho deste ambiente, verificou-se uma baixa estruturação na classe dos jovens, que também apresentou o padrão clinal sobre o espaço, e uma disposição quase que aleatória dos genótipos na classe dos adultos. Na terra firme, não se observou estruturação espacial dos genótipos e nem entre as classes de tamanho, estando os genótipos distribuídos aleatoriamente. As análises de parentesco das sementes indicaram que apenas 7,3% dos parentais paternos (16 indivíduos) foram encontrados no ambiente de terra firme e 9,4% (22 indivíduos) no baixio. Este baixo índice mostra que é grande a quantidade de fluxo gênico vindo de fora da área amostrada, sendo que no ambiente de baixio, além do fluxo de pólen, deve ocorrer também, provavelmente, o fluxo de sementes. Ainda com o uso deste teste, verificou-se fluxo gênico de longo alcance dentro da população estudada, com distâncias superiores a 1.000 metros, sendo a distância média de 888,8 m. O reconhecimento da existência de um baixo nível de estruturação genotípica na população estudada pode auxiliar no estabelecimento de medidas de conservação genética, indicando formas de maximizar a diversidade genética na coleta de sementes para a conservação *in situ*, e também no estabelecimento de práticas de manejo sustentável destas sementes.

Palavras-chave: Andiroba; Arbórea tropical; *Carapa guianensis*; Estrutura genética espacial; Determinação de parentesco; Marcadores microssatélites

**INTRAPOPULATION SPATIAL GENETIC STRUCTURE AND PATERNITY
INFERENCES IN *Carapa guianensis* (AUBLET.) IN AN NON-EXPLORED AREA OF
THE BRAZILIAN AMAZON REGION**

ABSTRACT

The importance of the knowledge of the spatial genetic structure is related to the establishment of sampling strategies in natural populations. Together with the paternity inference, it is an excellent tool for the definition of pollen flow and very useful for the establishment of strategies of management and conservation. The objectives of this study were to evaluate the spatial genetic structure of a population of *Carapa guianensis*, located in an area of Tropical Rainforest, in the State of Acre, in two distinct habitats (upland and lowland) and in two size classes (young and adults) within these habitats, and to estimate the maximum distance of gene flow through pollen between habitats. Seven microsatellite loci were used to analyze the genetic kinship between individuals (n = 497) of this population. Spatial autocorrelation was used to calculate the coancestry coefficient average between individuals within 10 distance intervals. For the paternity analyses, 217 seeds from the upland habitat and 234 from the lowlands were used and analyzed with the software Cervus 2.0. The autocorrelation spatial analysis of the genotypes showed that the population presented a clinal pattern of spatial variation, with the trees located at a distance of approximately 370 meters tending to be genetically similar. In the lowland habitat the same pattern was found, where trees located at a distance of 160 meters tended to be more related between themselves than the more distant trees. When each size class of this habitat was observed separately, a low spatial genetic structuring was found in the young classes, that also presented a clinal spatial pattern and an almost random disposal of the genotypes in the adult classes. In the upland habitat, a spatial genetic structure of the genotypes was not observed, as well as the size classes, indicating a random distribution of the genotypes. The paternity analysis of the seeds indicated that only 7.3% of the male parents (16 individuals) in the upland habitat and 9.4% (22 individuals) in the lowlands were found. This low index show that the amount of gene flow coming from outside the sampling area is high, and that in the lowland habitat, besides the pollen flow, seed flow must also probably occur. Using this same test, a long-distance gene flow within the population studied with distances superior to 1,000 meters was also verified, with the average distance of 888.8 m. The recognition of the existence of a low level of genotypic structuring in the population can assist in the establishment of measures of genetic conservation, indicating ways to maximize the genetic diversity during seed collecting for the *in situ* conservation, and also in the establishment of sustainable management practices of these seeds.

Keywords: Crabwood; Tropical trees; *Carapa guianensis*; Spatial genetic structure; Paternity analysis; Microsatellite markers

4.1 Introdução

A estrutura genética espacial ou autocorrelação espacial refere-se à distribuição espacial dos genótipos de indivíduos dentro de uma população, sendo característica para cada espécie. Ela é determinada pelos padrões de dispersão de pólen e sementes, densidade de indivíduos adultos, seleção micro ambiental, regeneração e pelo sistema de reprodução (HAMRICK; LOVELESS, 1986; LOISELLE et al., 1995; ODDOU-MURATORIO et al., 2004). Em populações naturais de plantas, o padrão e distância de dispersão de pólen e sementes são os principais fatores que influenciam na estrutura genética espacial (ENNOS, 1994; HAMRICK; MURAWSKI; NASON, 1993). Se a dispersão de pólen e sementes ocorre de modo aleatório dentro da população, esta não apresentará endogamia nem estruturação genética espacial (KALISTZ et al., 2001). Entretanto, se ambas as dispersões forem restritas, pode-se ter endogamia e forte estruturação genética espacial na população.

A existência de estrutura genética espacial, ou seja, a presença de indivíduos geneticamente correlacionados localizados próximos entre si, dentro da população, decorre principalmente das limitações físicas desta população, que impedem a ocorrência de cruzamentos aleatórios entre os indivíduos, havendo, desta forma, maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos mais próximos, o que gera redução de heterozigotos e a formação de grupos, estruturando a população (FUTUYMA, 1992).

Considera-se que uma variável apresenta estrutura espacial (ou autocorrelação espacial) quando os valores da variável de interesse observados em pares de locais distanciados entre si são mais similares (autocorrelação positiva) ou menos similares (autocorrelação negativa) do que o esperado para pares de observações associados ao acaso (LEGENDRE, 1993). A caracterização da estrutura genética espacial pode ser realizada por várias técnicas (ALVAREZ-BUYLLA et al., 1996a), sendo que uma das mais utilizadas é o índice I de Moran (ESCUDERO; IRIONDO; TORRES, 2003; LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005), que quantifica a similaridade genética entre pares de indivíduos espacialmente adjacentes. Este assume valores que podem variar de +1 (autocorrelação positiva) a -1 (autocorrelação negativa) (DEWEY; HEYWOOD, 1988). Outro coeficiente muito utilizado para estudo da estrutura genética espacial é o coeficiente de parentesco ou de coancestralidade (θ_{xy}) (ERIKSON; HAMRICK, 2003;

LOISELLE et al., 1995) que se baseia na probabilidade de se amostrarem aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência. Assim, em um modelo de isolamento por distância em que se espera que os indivíduos espacialmente mais próximos sejam mais correlacionados do que os mais distantes, pode-se esperar que a estimativa da coancestralidade diminua gradualmente entre os pares de indivíduos espacialmente mais próximos, em comparação com os de maiores distâncias geográficas (LOISELLE et al., 1995).

A importância do conhecimento da estrutura genética espacial esta relacionada com o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais, tanto para a conservação genética com para fins de melhoramento, possibilitando a formação de amostras mais significativas, e também para mitigar os efeitos de práticas de manejo (GANDARA, 1996). Em estudos populacionais, ela pode ser utilizada tanto para estimar o grau de isolamento de populações (GONZALES; HAMRICK, 2005), como em abordagens intrapopulacionais auxiliando na detecção de indivíduos aparentados (DOLIGEZ; JOLY, 1997), permitindo inferir sobre o alcance do fluxo gênico e o tamanho do grupo de vizinhança.

A análise de paternidade é uma excelente ferramenta para a definição do fluxo de pólen e, sendo também muito útil para o estabelecimento de estratégias de manejo e conservação. É um método no qual usualmente se emprega genótipos multilocos para inferir os pais de progênies de sementes de mães conhecidas, fornecendo a descrição da estrutura individual com detalhes (ZUCCHI, 2002). Esta análise usa um loco genético para identificar o mais provável pai de um conjunto de pais candidatos (HAMRICK; SCHNABEL, 1985) e após a identificação deste, pode-se ter uma idéia do padrão de movimento do pólen na população.

Os primeiros estudos de análise de paternidade eram baseados na estimativa de exclusão. Entretanto, este método pode identificar erroneamente o candidato a pai verdadeiro por apresentar alguns problemas causados por erros de genotipagem ou mutações (MARSHALL et al., 1998). A estatística Delta (Δ), definida por Marshall et al. (1998), auxilia na determinação da paternidade, baseada no método da máxima probabilidade que tolera erros de genotipagem e define o indivíduo com mais chance de ser o pai com base nas frequências alélicas.

O presente estudo teve como objetivos: a) estudar a estrutura genética espacial de uma população de *Carapa guianensis*, avaliando esta estrutura em dois ambientes distintos e em duas classes de tamanho dentro destes ambientes e b) estimar a distância máxima de fluxo gênico via pólen entre os ambientes. As hipóteses para este trabalho foram: a) a variabilidade genética encontra-se estruturada no espaço na população e dentro dos ambientes; b) ocorre estruturação espacial nas classes de menor tamanho e distribuição aleatória com o aumento de idade; c) ocorre fluxo gênico entre os ambientes de terra firme e de baixo.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em área de Reserva Florestal da Embrapa Acre (Latitude: 10° 01' 28" S e Longitude: 67° 42' 19" W), no município de Rio Branco/AC (Figura 1). A temperatura média anual é de 24,5°C, com uma estação seca que ocorre entre os meses de junho a agosto. A vegetação dominante nesta região é classificada como mata de floresta tropical úmida. A região possui topografia ligeiramente ondulada tendo áreas mais altas (terra firme) e áreas ocasionalmente inundadas (baixo).

4.2.1.2 Coleta das amostras

Foram demarcadas duas parcelas de 16 hectares (400m x 400m) cada, uma em ambiente de terra firme e outra no baixo. A distância máxima entre as duas áreas foi de 1000 metros e mínima de 500 m. Todos os indivíduos de *C. guianensis* com DAP maior ou igual a 15 cm foram mapeados e marcados com plaquetas metálicas devidamente numeradas. Foram coletadas amostras foliares de todos os indivíduos marcados nas parcelas. O número total de indivíduos com DAP \geq 15 cm mapeados foi 506, sendo 204 em ambiente de terra firme e 302 no baixo. Esses foram divididos em duas classes de tamanho de acordo com o DAP. Foram incluídos na classe Jovens aqueles com mais de 10 m de altura, com DAP entre 15 a 25 cm e na classe Adultos os indivíduos com mais de 10 m de altura e com DAP maior que 25 cm.

Para a análise de paternidade foram selecionadas 20 árvores reprodutivas em cada ambiente, para coleta de plântulas que se localizavam sob a copa dessas árvores. Todas as amostras foram secas imediatamente após a coleta em recipientes contendo sílica gel e enviadas para o Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em Brasília/DF, onde foram realizadas as análises genéticas.

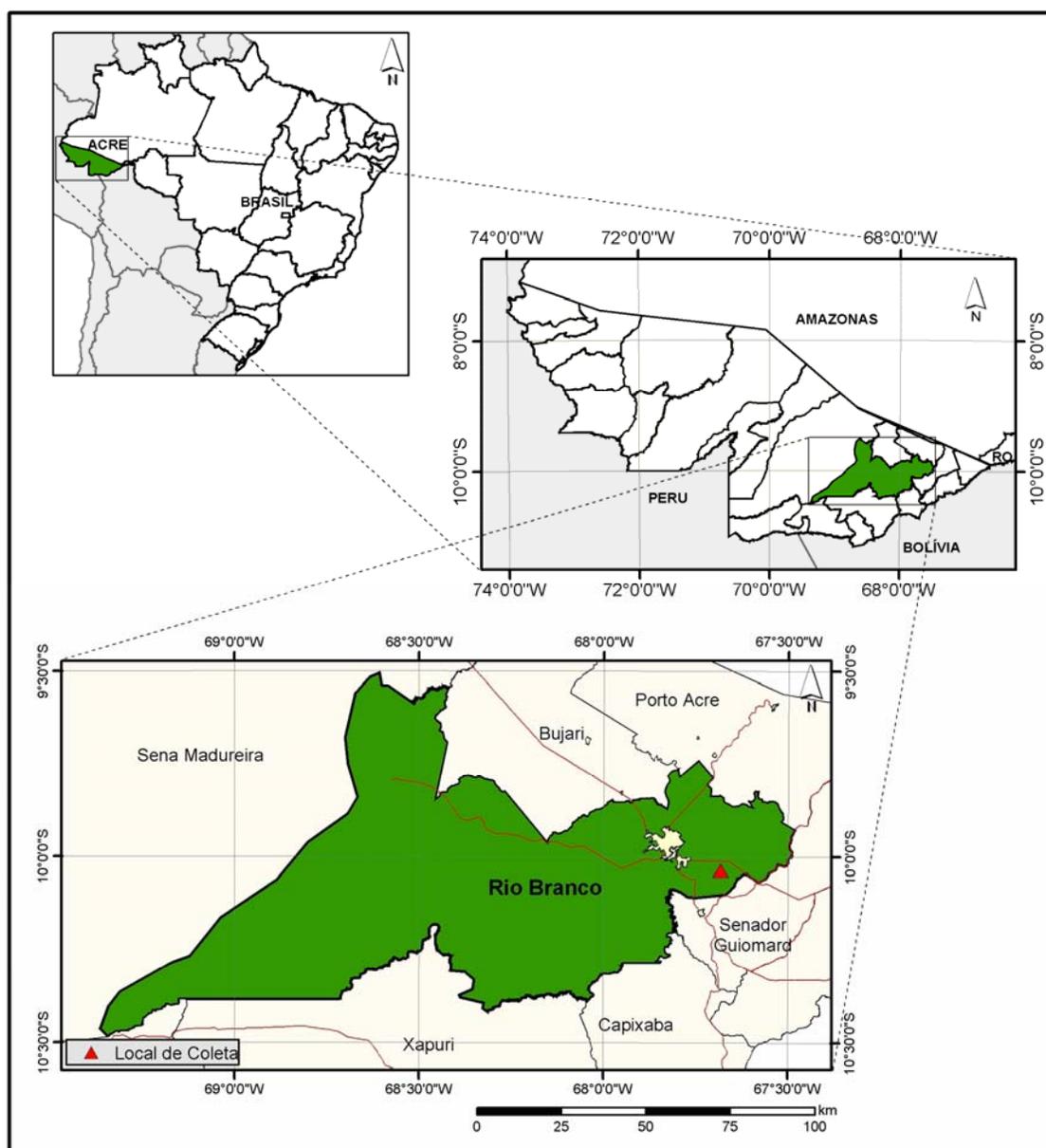


Figura 1 - Mapa de localização da área de coleta de *Carapa guianensis*, no município de Rio Branco/AC. O triângulo vermelho representa o local onde ocorreram as coletas

4.2.1.3 Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o procedimento de CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1987) adaptado por Machado et al. (2002) que utiliza a máquina Fastprep – BIO 101 SAVANT para a trituração do material vegetal ao invés de nitrogênio líquido. Aproximadamente 30 mg de folhas secas foram colocadas em microtubos de 2 ml contendo uma conta de cerâmica grande e sobre as amostras foi colocada uma conta de porcelana pequena. Adicionou-se 700 µl de tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2 M de EDTA, 1% de PVP, 0,1 M de Tris-HCl) previamente aquecido a 65°C, acrescido de 2% de β-mercaptoetanol. Os microtubos foram levados para a máquina Fastprep por 40 segundos, e em seguida colocados em banho-maria à temperatura de 65°C durante 60 minutos. Após este tempo foi acrescentado a cada microtubo 600 µl de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico), que é um solvente orgânico, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. Com este procedimento, obteve-se a separação das fases aquosa e orgânica.

Foram retirados aproximadamente 500 µl do sobrenadante (fase aquosa) e transferidos para microtubos de 1,5 ml. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 400 µl de isopropanol a -20°C. Os microtubos foram mantidos a -20°C por cerca de 30 minutos e, em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos, para formação do precipitado de DNA (“pellet”). O isopropanol foi descartado, e o “pellet” foi lavado duas vezes com adição de 500 µl de etanol 70%, com agitação vigorosa e centrifugação. Foi feita uma terceira lavagem com adição de 500 µl de etanol absoluto. Este foi retirado gentilmente e os “pellets” ficaram secando à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, foram acrescentados 30 a 50 µl de solução TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA) com RNase (0,5 mg) aos microtubos com a finalidade de ressuspender o DNA do “pellet”.

Depois de extraído, o DNA genômico foi quantificado por meio da análise comparativa de cada amostra com o DNA fago λ de peso conhecido (20 a 200 ng) em eletroforese em géis de agarose 1% (0,3 g de agarose; 30 ml TBE 1X - 93 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA ; 4,5 µl de brometo de etídio (1 mg/ml)). A concentração das amostras foi estimada por comparação visual da intensidade de

fluorescência de suas bandas com as do DNA padrão. Posteriormente, o DNA foi diluído em água MilliQ a 1ng/μl.

4.2.1.4 Análises genéticas

Foram utilizados sete pares de iniciadores específicos para *Carapa guianensis*, cinco desenvolvidos por Vinson et al. (2005) (Cg 01, Cg 06, Cg 12, Cg 16 e Cg 17), e dois por Dayanandan et al. (1999) (Cg 05, Cg 07, chamados aqui de Cg 05p e Cg 07p, respectivamente) (Tabela 1). O iniciador “forward” de cada loco foi marcado com um fluorocromo específico (HEX, 6-FAM e NED). Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados um ou dois locos de SSR por reação. Utilizou-se o iniciador “forward” de cada loco marcado com um fluorocromo diferente, ou com o mesmo fluorocromo, porém com amplitudes alélicas distintas, por reação.

Tabela 1 – Seqüência dos pares de iniciadores polimórficos que amplificaram locos microssatélites (SSR) em *Carapa guianensis*, com as respectivas amplitudes alélicas em pares de base, temperatura de hibridação (T_a) e número total de alelos por loco (\hat{A})

Loco	Fluorocromo	Seqüência do iniciador (5' – 3')	Amplitude Alélica (pb)	T_a (°C)	\hat{A}
Cg 01	NED	F: CCT GGG A CG TAT T TC TGC TG	170-204	56	10
		R: GCA GCA GCA CCT CTC TCT TT			
Cg 06	NED	F: ACC CTC GCC TCC TTT GTT	132-156	56	7
		R: TGA GTC GAC ATG TGT CAG CA			
Cg 12	6-FAM	F: TGA AAA GAC CAA TGC ATG AGA	145-165	52	7
		R: CAT TGC GGG TAC ACA GTT T			
Cg 16	6-FAM	F: CGC TAT TGA GCG TGT GAG AC	153-183	56	14
		R: GTG GGA GCA GAT CTG AAA GC			
Cg 17	6-FAM	F: ATT TAG GCC ATT GCA GGC TA	199-235	52	15
		R: ACG TTT GGT ATC GGA ACT GC			
Cg 05p	HEX	F: TGC ATT TCT TCT CCT TGC TTC TGG	168-204	56	14
		R: TCT TGT ACG TTG GCT CTT GCA CAT TC			
Cg 07p	HEX	F: AAG ACT TCC CCC AGA TTT GTT TTT	198-254	52	18
		R: TGT ACC AGT TCA GTT GAT GCT CA			

As reações de PCR foram otimizadas para 6 µl de volume final, contendo 1 ng de DNA genômico; 1X de tampão de reação da PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, pH 8,3, Phoneutria); 0,25 µM de cada iniciador (“forward” marcado e “reverse”); 0,27 ng/ml de BSA (Albumina Sérica Bovina, Biolabs); 0,27 mM de dNTP e 0,125 U Taq polimerase (Phoneutria) e água MilliQ autoclavada. As amplificações foram realizadas utilizando os termocicladores 9600 e 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica para cada par de iniciadores por 1 minuto (Tabela 1), 72 °C por 1 minuto e terminando com uma etapa de alongamento a 72°C por 7 minutos.

O produto das reações foi diluído na proporção 1:3 (1 µl de reação para 3 µl de água MilliQ). Em seguida, 1 µl dessa diluição foi colocado em placa microtitulação de 96 poços, que continha 9 µl de formamida HiDi, 0,25 µl de marcador interno fluorescente (ROX) (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001) e 0,75 µl de água MilliQ. Após a desnaturação (95°C por 3 minutos), a placa foi levada para o seqüenciador ABI 3700 da Perkin Elmer, onde ocorreu a eletroforese e detecção dos fragmentos amplificados. A detecção e a estimativa do tamanho dos alelos em pares de base foram realizadas com o uso do programa GeneScan (APPLIED BIOSYSTEMS versão 3.7, 2001). Em seguida os valores foram importados para o programa Genotyper (APPLIED BIOSYSTEMS versão 2.0, 1996) para filtragem de picos, interpretação e compilação final dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo. Para cada loco as estimativas do tamanho dos alelos em pares de base foram determinadas como sendo par ou ímpar de acordo com o tamanho previsto no desenvolvimento do marcador. Alelos com tamanho estimado intermediário às classes esperadas foram definidos como alelos da classe mais próxima (inferior ou superior) com maior frequência.

4.2.1.5 Correlação espacial dos genótipos

Para a análise da correlação genética espacial utilizaram-se 497 indivíduos da população, 203 em ambiente de terra firme e 294 no baixo. Por meio desta análise procurou-se verificar a presença e extensão da estrutura espacial dentro da população, assim como em cada ambiente e entre duas classes de tamanho (Jovens e Adultos). Utilizou-se o programa Spagedi versão 1.1 (HARDY; VEKEMANS, 2002) que calcula o

coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) entre pares de árvores dentro de classes de distância com intervalos constantes.

O coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) para cada classe de distância foi calculado como proposto por Loiselle et al. (1995), definindo para cada alelo k em cada par de indivíduos, x e y , de acordo com a equação:

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{(p_x - \bar{p}_k)(p_y - \bar{p}_k)}{\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)} + \frac{1}{(2n - 1)}$$

Em que:

p_x e p_y = freqüências do alelo k nos indivíduos x e y (assumindo valores 0, 0,5 e 1 em indivíduos homozigotos para o alelo alternativo, heterozigotos e homozigotos para o alelo considerado, respectivamente).

\bar{p}_k = media da freqüência do alelo k na subpopulação com tamanho amostral n .

Este método é baseado na probabilidade de dois alelos iguais em indivíduos diferentes serem idênticos por descendência. Este coeficiente foi estimado para 10 classes de distância estabelecidas, usando o coeficiente de coancestria.

4.2.1.6 Análises de paternidade

Partindo-se da pressuposição de que ocorre fluxo gênico entre os indivíduos dos dois ambientes, buscou-se inferir sobre a procedência das sementes oriundas das duas áreas. Utilizou-se o teste de paternidade pelo programa CERVUS 2.0 (MARSHALL et al., 1998). As análises foram conduzidas a partir dos genótipos de 38 árvores maternas e suas progênes (217 no ambiente de terra firme e 234 no baixio) e de 257 árvores adultas candidatas à parental paterno.

O programa CERVUS 2.0 calcula para cada loco a razão da máxima probabilidade (*likelihood ratio*, LR) entre as probabilidades de duas hipóteses alternativas para cada candidato a pai. A hipótese H_1 representa o candidato a pai verdadeiro e H_0 representa um candidato a pai de ocorrência aleatória na população, de modo que a razão de máxima probabilidade é:

$$LR = \frac{H_1}{H_0}$$

Para cada candidato é calculada uma *LR* total, por multiplicação das *LR* de cada loco individual, assumindo-se segregação independente entre locos. O logaritmo natural (log) deste *LR* total é denominado de *LOD score* (MEAGHER, 1986) o qual difere do *LOD score* utilizado em mapeamentos genéticos. Um *LOD score* positivo indica que o candidato é mais provável de ser o pai verdadeiro, do que um outro selecionado aleatoriamente. Quando dois ou mais candidatos apresentaram um *LOD score* positivo, uma estatística Δ (delta) foi aplicada. Essa estatística é definida como sendo a diferença do *LOD score* entre o pai mais provável (maior *LOD score* positivo) e o segundo pai mais provável (segundo maior *LOD score* positivo). A significância dos valores de Δ é testada por testes de paternidade simulados pelo programa.

A simulação utiliza as freqüências alélicas observadas na população para simular dados genéticos e conduzir testes de paternidade para um grande número de progênies, com o objetivo de gerar distribuições do Δ . As simulações levam em conta o número de candidatos a pai, a proporção amostrada de candidatos a pai, a proporção de locos que foram genotipados nos indivíduos e a freqüência de erros de genotipagem. Na etapa final da simulação são gerados valores críticos de Δ , de modo que a significância dos valores de Δ encontrados nos testes de paternidade conduzidos na população estudada possa ser determinada. A árvore candidata a pai com o maior *LOD score* será indicada como pai se a diferença entre o seu *LOD score* e o do segundo candidato a pai (Δ score) for maior do que o Δ crítico.

Os parâmetros usados nas inferências de paternidade com o programa CERVUS foram os seguintes: admitiu-se que cada árvore materna tinha 257 árvores como supostos pais; que a proporção de árvores adultas amostradas foi de 85%; que a proporção de locos genotipados foi de 100% e que a taxa de erro de genotipagem foi de 0,01 (1%). Foram usadas 10.000 repetições nas simulações e os níveis de confiança restrito de 95% e relaxado de 80% para determinar o verdadeiro parental paterno.

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Estrutura genética espacial

Verifica-se no gráfico de correlação genética espacial, demonstrando a distribuição espacial dos genótipos dentro da população estudada (Figura 2), um padrão clinal de variação espacial, onde se tem valores positivos e significativos nas primeiras cinco classes de distância, associados a valores negativos e significativos nas últimas classes. Assim, as árvores localizadas a uma distância de até aproximadamente 370 metros tendem a ser geneticamente similares, sendo que essa semelhança decai com o aumento da distância até que a partir de 793 metros as árvores sejam geneticamente menos relacionadas.

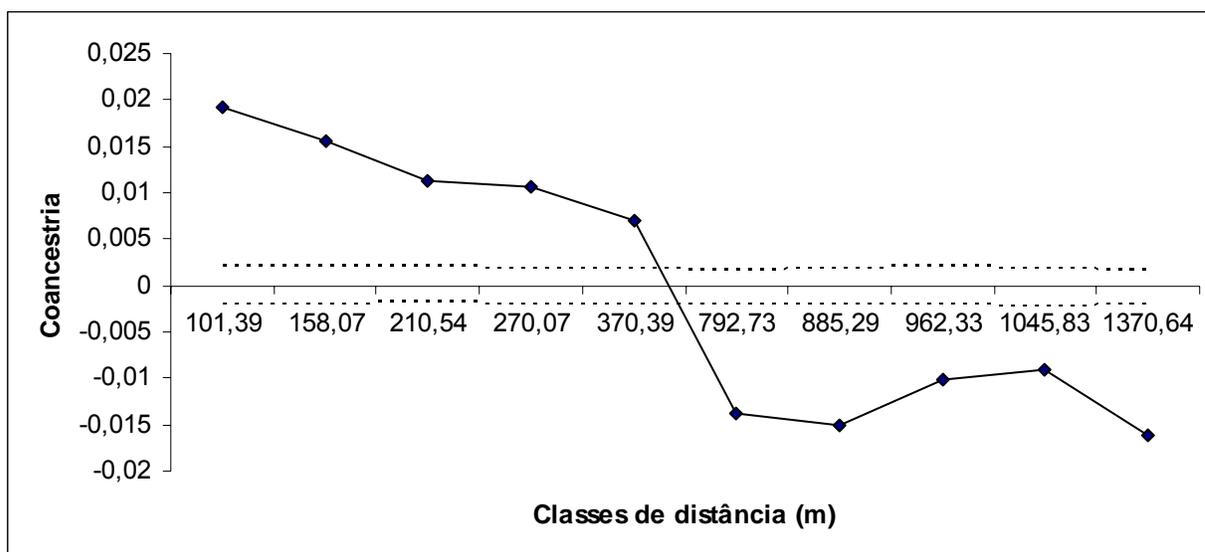


Figura 2 - Correlograma do coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) em dez classes de distâncias entre árvores de uma população de *Carapa guianensis*. (Linhas tracejadas indicam o limite inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)

Não foi observada estruturação espacial dos genótipos no ambiente de terra firme e nem entre as classes de tamanho, jovens e adultos dentro deste ambiente, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Figura 3). Este padrão sugere uma disposição aleatória dos genótipos neste ambiente.

Já no ambiente de baixo, verificou-se um padrão clinal na variação espacial, com tendência à estruturação, sendo que árvores localizadas a uma distância de até aproximadamente 150 metros tendem a serem mais aparentadas entre si, e que árvores mais distantes são geneticamente não relacionadas, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Figura 4). Quando se observa separadamente cada classe de tamanho deste ambiente, verifica-se uma baixa estruturação na classe dos jovens, que também apresenta o padrão clinal sobre o espaço, e uma disposição quase que aleatória dos genótipos na classe dos adultos.

4.2.2.2 Análises de paternidade

A probabilidade de exclusão de paternidade utilizando no mínimo seis locos SSR variou de 0,063 (loco Cg 01) a 0,491 (loco Cg 16) para a primeira probabilidade (Excl (1): probabilidade de excluir um candidato a pai, quando não se conhece nenhum dos parentais), e de 0,159 (loco Cg 01) a 0,663 (loco Cg 16) para a segunda probabilidade (Excl (2): probabilidade de excluir um candidato a pai, quando se conhece um dos parentais), atingindo poder de exclusão total para os locos combinados de 0,884 para Excl (1) e 0,978 para Excl (2) (Tabela 2).

No ambiente de terra firme, das 217 progênes coletadas foram encontrados os parentais paternos em apenas 7,34%, ou seja, em 16 indivíduos o Δ score foi superior ao Δ crítico no nível de 80% de probabilidade. Destes, em quatro indivíduos o Δ score foi superior ao Δ crítico no nível de 95% de probabilidade. Já no ambiente de baixo, das 234 progênes coletadas, 9,40% tiveram seus pais encontrados, ou seja, 22 indivíduos apresentaram o Δ score superior ao Δ crítico no nível de 80% de probabilidade. Os valores dos Δ scores críticos de 80% e 95% são observados na Tabela 3.

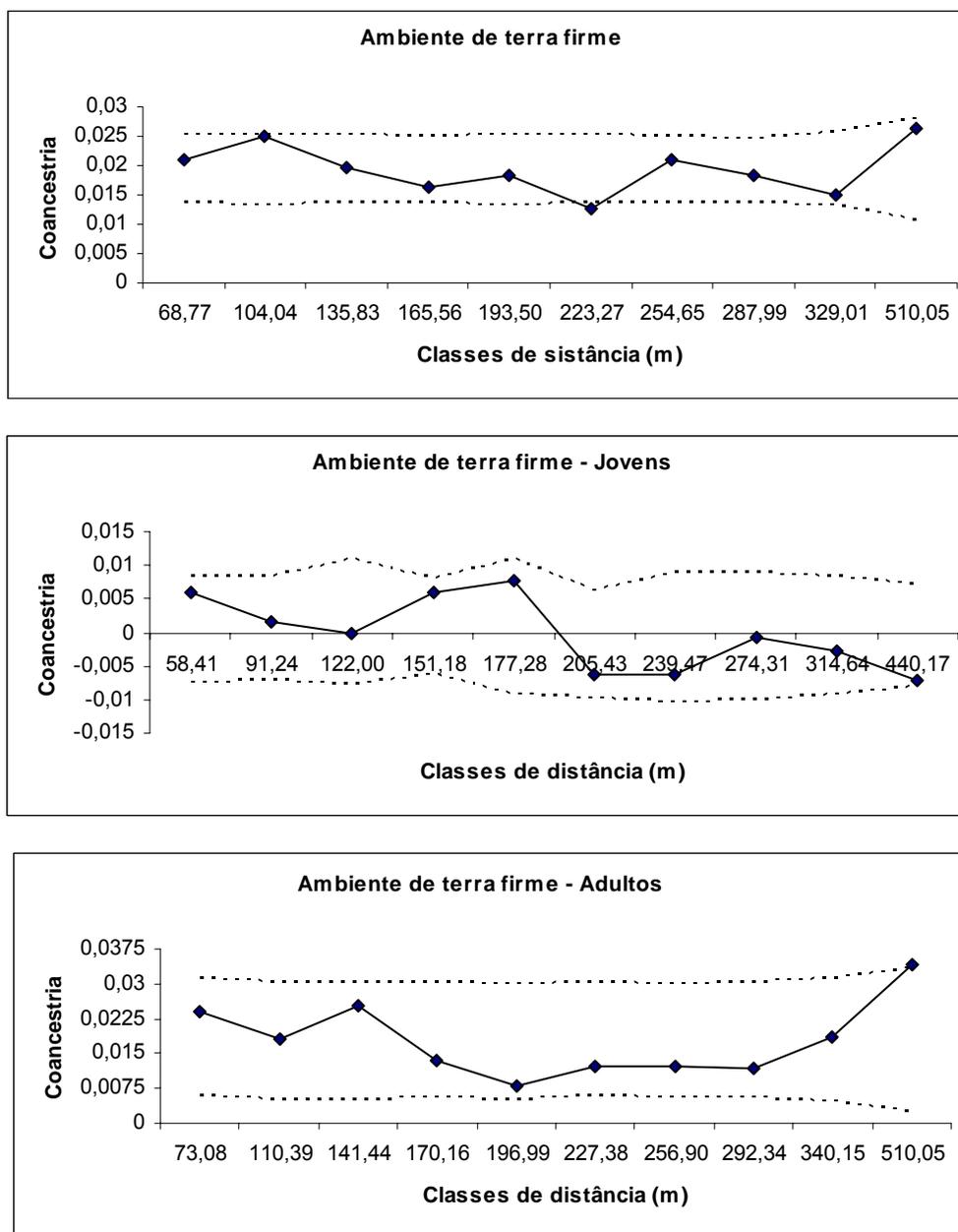


Figura 3 - Correlograma do coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) em dez classes de distâncias entre árvores de uma população de *C. guianensis* no ambiente de terra firme e nas duas classes de tamanho dentro deste ambiente. (Linhas tracejadas indicam o limite inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)

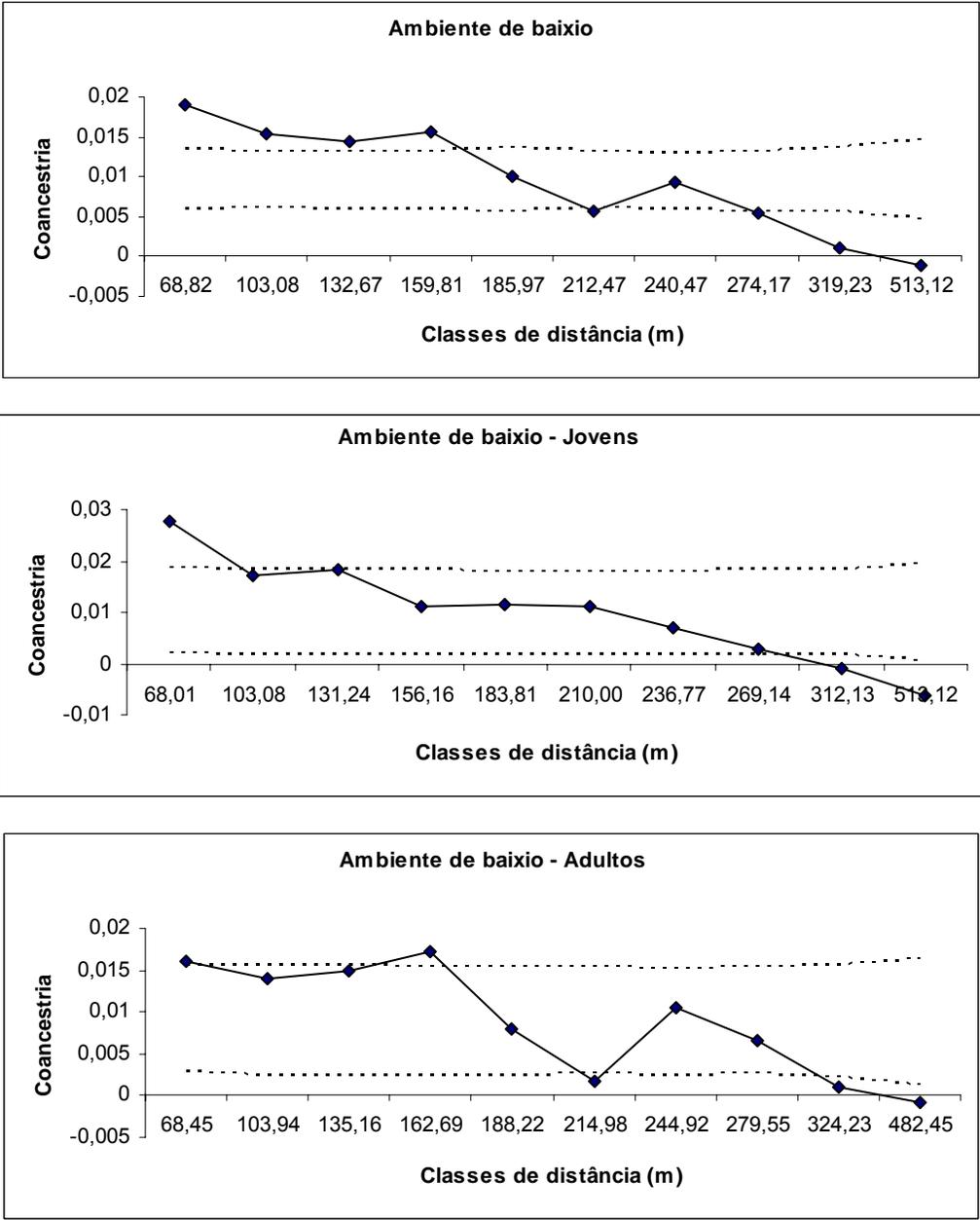


Figura 4 - Correlograma do coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) em dez classes de distâncias entre árvores de uma população de *C. guianensis* no ambiente de baixo e nas duas classes de tamanho dentro deste ambiente. (Linhas tracejadas indicam o limite inferior e superior do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade e a linha contínua representa a estimativa do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle et al., 1995)

Tabela 2 – Probabilidades de exclusão de paternidade Excl (1) e Excl (2) para seis locos microssatélites no estudo de uma população natural de *Carapa guianensis*

Locos	Excl (1)	Excl (2)
Cg 01	0,063	0,159
Cg 06	0,074	0,170
Cg 12	0,168	0,286
Cg 16	0,491	0,663
Cg 17	0,212	0,359
Cg 05 p	0,415	0,593
Cg 07 p	0,313	0,500
Total	0,884	0,978

Nota: Excl (1) - probabilidade de excluir um candidato a pai, quando não se conhece nenhum dos parentais; Excl (2) - probabilidade de excluir um candidato a pai, quando se conhece um dos parentais.

Tabela 3 – Valores de Δ scores críticos para o ambiente de terra firme e de baixio no estudo de uma população natural de *Carapa guianensis*

Ambientes	Nível de confiança	
	Δ_c 80 %	Δ_c 95 %
Terra firme	1,07	2,06
Baixio	1,03	2,27

Com o uso do teste de paternidade foi possível verificar a distância de fluxo gênico de pólen entre os indivíduos dentro de cada ambiente e entre eles (Tabela 4). Note que os indivíduos numerados de 1 a 204 fazem parte do ambiente de terra firme, e os de 655 a 957 do baixio. A distância mínima de fluxo entre os ambientes foi de 610,01 metros e a máxima de 1073,61 m. Dos 16 indivíduos que tiveram o pai provável detectado no ambiente de terra firme, a metade deles estavam no ambiente de baixio e a outra metade na terra firme. Já no ambiente de baixio, verifica-se que dos 22 indivíduos que tiveram seus pais encontrados, 16 deles estavam no mesmo ambiente e apenas seis eram provenientes da terra firme (Tabela 4). Em apenas um dos indivíduos foi observada autofecundação.

Tabela 4 – Resultado do teste de paternidade realizado em uma população de *Carapa guianensis*

Ambiente de terra firme				
Mãe	Pai provável	LOD	Delta	Distância (m)
5	819*	4,5324	1,1455	938,95
16	46	4,3773	1,2318	165,00
16	770*	5,5248	2,5453	1010,61
26	924*	4,5657	2,4901	793,46
53	731*	5,2496	1,3266	823,02
67	200	4,8887	1,8192	278,49
74	124	4,5075	2,3255	84,43
89	7	3,5626	1,2165	299,84
89	86	5,3579	1,2790	259,86
89	857*	4,1327	1,2261	1035,97
100	790*	3,9638	1,6382	1073,61
106	178	3,9241	1,1716	408,34
130	114	4,3061	2,1549	142,13
179	865*	4,1435	1,1194	610,01
179	178	4,8386	2,2868	36,62
179	692*	3,8371	1,0771	887,11
Ambiente de baixio				
Mãe	Pai provável	LOD	Delta	Distância (m)
667	657	4,9469	1,3511	78,26
667	671	5,0151	2,2210	70,00
667	884	4,3101	1,0531	333,41
667	771	3,3048	1,9987	122,41
708	81*	4,7416	1,7696	1004,98
709	179*	6,1977	1,4546	808,68
709	3*	5,3892	1,5179	981,07
709	957	3,7096	1,0824	321,50
737	897	4,0847	1,5125	160,01
740	731	4,1953	1,2484	131,86
758	919	4,9274	1,3226	254,91
793	839	5,2185	1,5957	133,52
791	10*	5,4184	2,0159	674,05
791	137*	4,2647	1,2185	892,42
831	78*	5,0471	1,6648	908,94
831	858	4,6734	1,0918	249,34
837	771	3,5098	1,3459	265,65
862	674	3,6566	1,5895	239,63
862	708	4,0953	1,2744	176,23
881	663	4,2931	1,8400	341,88
878	874	4,2963	1,8447	125,90
878	878	4,1965	1,1124	endogamia

* Pais provenientes de ambientes diferentes das mães.

4.2.3 Discussão

As análises realizadas permitiram avaliar o padrão espacial de variação genética de uma população de *C. guianensis*. Esse padrão poderá ser adequadamente compreendido quando se considerarem, também, características ecológicas da planta. A andiroba é uma espécie bastante plástica, ocorre tanto em ambiente de terra firme como no baixo, sendo que neste último em maior densidade. Estudos ecológicos realizados na mesma área do presente estudo (KLIMAS, 2006), verificaram que ambos os ambientes possuem distribuição espacial agregada e que a espécie possui distribuição do tipo “J” invertido, ou seja, com um número grande de indivíduos nas menores classes de tamanho. Uma característica que deve ser ressaltada é que ela é uma planta monóica, seus frutos são deiscentes e as suas sementes possuem dispersão primária pela gravidade, e posteriormente por animais e pela água.

Na população estudada ocorreu uma tendência de estruturação entre indivíduos mais próximos, sendo que esta diminuiu à medida que a distância aumentou. Apesar da coancestria ter sido baixa, ela foi significativa. Vários estudos sobre a estrutura genética têm sido realizados em espécies arbóreas tropicais. Estes relatam que ocorrem variações nos níveis de estruturação genética espacial destas espécies. A presença de estruturação genética significativa, como em algumas populações de *Cryptocarya moschata* (MORAES; MONTEIRO; VENCOVSKY, 2004), *Solanum lycocarpum* (MARTINS et al., 2006) e *Hymenaea courbaril* (CASTELLEN, 2005), deve ser devido ao fluxo gênico restrito que ocorre nestas plantas. Já em espécies que possuem intenso fluxo gênico, ocorre a distribuição espacial aleatória dos genótipos como observado em *Cedrella fissilis* (GANDARA, 1996; PÓVOA, 2002), em *Platyidium elegans* (HAMRICK; MURAWSKI; NASON, 1993) e *Carapa procera* (DOLIGEZ; JOLY, 1997).

Pesquisas utilizando simulações têm mostrado que o padrão de distribuição espacial em espécies arbóreas é influenciado por diversos fatores, tais como: densidade populacional, dispersão de pólen e sementes, sobreposição de gerações, sistema de auto-incompatibilidade, micro ambiente, dentre outros (DOLIGEZ; BARIL; JOLY, 1998). Assim, estudos em uma mesma espécie, em vários ambientes, podem permitir examinar a correlação entre os ambientes.

A análise da estrutura genética espacial nos dois ambientes demonstrou que o ambiente de baixo apresentou baixa estruturação dos genótipos, fato que não foi observado na terra firme, que apresentou disposição aleatória. Quando se observam as duas classes de tamanho (jovens e adultos) dentro de cada ambiente, verifica-se que na terra firme ocorreu disposição aleatória dos genótipos nas duas classes estudadas. Já no baixo a classe dos jovens apresentou maior tendência de ter os genótipos estruturados do que a dos adultos.

Alguns estudos mostram que espécies arbóreas tropicais podem apresentar vários padrões de agregação espacial, onde indivíduos mais jovens tendem a apresentar estruturação genética espacial, enquanto os indivíduos mais velhos possuem distribuição aleatória (NG; LEE; KOH, 2004). Hamrick; Murawski e Nason (1993) verificaram que nestas espécies, os indivíduos mais próximos possuem mais alelos em comum do que os mais distantes, e que a estrutura de família tende a desaparecer nos estágios mais avançados do ciclo de vida. Loiselle et al. (1995) observaram baixa estruturação genética em cinco subpopulações de *Psychotria officinalis*, na Costa Rica. Eles verificaram que os indivíduos distantes entre si por 5 metros tinham seus genótipos mais correlacionados, do que outros em maiores classes de distância, e atribuíram este fato à provável restrita dispersão de sementes, assim como a proximidade de indivíduos aparentados. Doligez e Joly (1997) verificaram que não ocorre diferença significativa no padrão espacial de distribuição dos genótipos entre adultos e sementes coletadas antes da dispersão em *Carapa procera*, espécie do mesmo gênero que *C. guianensis*, que ocorre nas Guianas. Eles sugerem que o amplo fluxo gênico de pólen deve ser o principal fator da não ocorrência de estruturação espacial nesta espécie.

Chung, Epperson e Chung (2003) estudando várias classes de idade em *Camellia japonica*, espécie asiática, observaram que a estrutura genética espacial tende a dissipar-se com o aumento da idade. Alvarez-Buylla et al. (1996b) estudando *Cecropia obtusifolia*, no México, observaram forte estruturação genética nas plântulas, enquanto que esta foi menos evidente em estágios de vida mais avançados, embora fosse mantida até a idade adulta, devido à limitada dispersão de sementes.

Uma provável explicação para não ter ocorrido estruturação dos genótipos na espécie em estudo, no ambiente de terra firme, pode estar relacionada ao intenso e amplo fluxo gênico de pólen, já que neste ambiente a movimentação de sementes não se dá a longas distâncias.

Relativamente poucos estudos têm sido realizados para avaliar a estrutura genética espacial em espécies arbóreas que ocupam diferentes ambientes. Cruse-Sanders e Hamrick (2004) verificaram que o agrupamento espacial das plantas em populações de *Panax quinquefolius*, é provavelmente devido também à heterogeneidade micro ambiental, uma vez que os indivíduos adultos estavam espacialmente aglomerados, mas não apresentavam valores de coancestria significativos, como encontrados nos jovens. Ng et al. (2006) estudando três espécies arbóreas tropicais com diferentes preferências de ambientes e divididas por classe de idade, verificaram que a espécie *Shorea macroptera*, que ocorre tanto em áreas altas como baixas da Malásia, apresentou estrutura genética espacial significativa para indivíduos com maior idade, ou seja, de maior classe de tamanho, independente do ambiente de ocorrência. Cloutier et al. (2007) estudando uma população de *C. guianensis* localizada em ambiente de terra firme, antes e depois do manejo florestal, verificaram que o coeficiente de coancestria diminuiu com o aumento da classe de distância, em três classes de tamanho, como o esperado pelo isolamento pela distância. Observaram também que ocorre uma tendência à estruturação dos indivíduos com menor classe de tamanho nesta população, e que o corte seletivo das árvores não alterou o padrão genético espacial de indivíduos adultos.

As análises de paternidade revelaram um baixo número de sementes que tiveram o parental paterno encontrado, 7,34% e 9,40%, respectivamente para ambiente de terra firme e baixo. Este baixo índice mostra que é grande a quantidade de fluxo gênico vindo de fora da área amostrada, sendo que no ambiente de baixo, além do fluxo de pólen, provavelmente deve ter ocorrido o fluxo de sementes. Alguns estudos demonstram que em florestas tropicais, onde se tem uma grande variedade de ambiente e espécies, os testes de paternidade na maioria das vezes conseguem encontrar baixo número de parentais. Em estudos com regenerantes de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) utilizando oitos locos de SSR por probabilidade de exclusão,

Ciampi (1999) encontrou baixo número de parentais. A autora comenta que com a diminuição do número de locos analisados, tem-se baixa confiabilidade nas determinações de exclusões e tendência a superestimação no número de descendentes com os progenitores encontrados. Gaiotto; Grattapaglia e Vencovsky (2003), analisando a estrutura genética de duas populações de *Euterpe edulis*, uma palmeira de ocorrência tropical, determinaram ambos os parentais em 23,4% e 13,9%, respectivamente para o Parque Nacional de Brasília e para a Reserva Ecológica do Instituto de Geografia e Estatística Brasileiro. Por outro lado, Sato et al. (2006) em estudos populacionais em *Cercidiphyllum japonicus*, espécie de dossel de ocorrência em florestas temperadas no Japão, encontraram o parental masculino de 70,8% das plântulas. Este alto índice deve estar relacionado com a maior densidade de indivíduos que ocorre neste tipo de floresta.

A hipótese de que ocorre fluxo gênico entre os ambientes teve suporte com os resultados apresentados na Tabela 4. Ainda com o uso deste teste, verificou-se fluxo gênico de longo alcance dentro da população estudada com distâncias superiores a 1.000 metros, sendo a distância média de 888,8 m. Gandara (1996), estudando *Cedrela fissilis*, espécie da mesma família que *C. guianensis*, também detectou distância longa de fluxo gênico. Cloutier et al. (2007), em estudos com *C. guianensis* em ambiente de terra firme, verificaram uma distância máxima de 265 m antes do corte seletivo das árvores na Flona Tapajós no Pará. O fato de terem sido encontradas distâncias de fluxo via pólen superiores a 1000 m, indica que nesta população o fluxo gênico esta sendo amplo o suficiente para prevenir a formação de agregados de genótipos semelhantes. Este fato pode ser observado no correlograma da Figura 1, que indicou fraca estruturação, sendo que esta deve ser devido à forma com que ocorre a dispersão primária das sementes, ou seja, há uma tendência de se formarem agregados de parentes, mas este é baixo, provavelmente por ocorrer mortalidade de plântulas e grande predação de sementes.

O reconhecimento da existência de um baixo nível de estruturação genotípica na população estudada pode auxiliar no estabelecimento de medidas de conservação genética, indicando formas de maximizar a diversidade genética na coleta de sementes para a conservação *in situ*, e também no estabelecimento de práticas de

manejo sustentável destas sementes. Com base nos resultados apresentados pode-se sugerir que: 1) a coleta de sementes para a conservação *in situ* não deve ser realizada em árvores localizadas dentro de distâncias inferiores a 371 metros, para evitar que sejam coletadas sementes de árvores aparentadas, o que reduz o tamanho efetivo populacional; e 2) a coleta de sementes para o manejo deve ser realizada em árvores localizadas dentro de distâncias inferiores a 371 metros, assim se evita a coleta de sementes com maior potencial de variabilidade genética.

4.3 Conclusões

Existe baixo nível de estruturação genética espacial na população estudada, sendo que esta é observada no ambiente de baixo, mas não na terra firme, que possui os genótipos distribuídos aleatoriamente no espaço. Os indivíduos com menor classe de tamanho e, conseqüentemente, menor idade, possuem estruturação espacial dos seus genótipos quando comparados com os indivíduos com maior classe de tamanho, no ambiente de baixo. Já na terra firme este fato não foi observado.

Com o teste de paternidade observou-se um baixo índice de descendentes com ambos parentais encontrados dentro da área amostrada, indicando que é grande a quantidade de fluxo gênico vindo de fora.

Verificou-se existência de fluxo gênico via pólen entre os dois ambientes, com distância máxima superior a 1.000 metros e média de 888,8 m.

Referências

ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; GARCÍA-BARRIOS, E.; LARA-MORENO, C.; MARTÍNEZ-RAMOS, M. Demographic and genetics models in conservation biology: Applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 386-421, Mar. 1996a.

ALVAREZ-BUYLLA ER, CHAOS AC, PINERO D, GARAY AA. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. **Evolution**, Lancaster, v. 50, n. 3, p. 1155-1166, June 1996b.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Genescan 3.7**. Califórnia, 2001. 1 CD-ROM.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Genotyper 2.0**. Califórnia, 1996. 1 CD-ROM.

BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. A simple and cost effective method to synthesize a fluorescent labeled internal DNA standard for fragment sizing in an automatic sequencer. **Biotechniques**, Natick, v. 31, n. 4, p. 793-800, Oct. 2001.

CASTELLEN, M. S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Humanaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**. 2005. 104p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CHUNG, M.Y.; EPPERSON, B.K.; CHUNG, M.G. Genetics structure of age classes in *Camellia japonica* (Theaceae) **Evolution**, Lancaster, v. 57, n. 1, p. 62-73, Jan. 2003.

CIAMPI, A.Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera Langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado**. 1999. 204p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1999.

CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 797-809, Feb. 2007.

CRUSE-SANDERS, J.M.; HAMRICK, L. Spatial and genetic structure within populations of wild american ginseng (*Panax quinquefolius* L., Araliaceae). **Journal of Heredity**, Washington, v. 95, n. 4, p. 309-321, July 2004.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELE, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 1585-1592, Oct. 1999.

DEWEY, S.E.; HEYWOOD, J.S. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. Distribution of genotypes. **Evolution**, Lawrence, v. 42, n. 4, p. 834-838, July 1988.

DOLIGEZ, A.; JOLY, H.I. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. **Heredity**, London, v. 79, n. 1, p. 72-82. July 1997.

DOLIGEZ, A.; BARIL, C.; JOLY, H.I. Fine-scale spatial genetic structure with nonuniform distribution of individuals. **Genetics**, Austin, v. 148, n. 2, Feb. 1998.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n.1, p. 13-15, Jan. 1987.

ENNOS, R.A. Estimating the relative rates of pollen and seeds migration among plant populations. **Heredity**, London, v. 72, n. 3, p. 250-259, Mar. 1994.

ERICKSON, D. L.; HAMRICK. J.L. Genetic and clonal diversity for *Myrica cerifera* along a spatio temporal island chronosequence. **Heredity**, London, v. 90, n. 1, p. 25-32, Jan. 2003.

ESCUDERO, A; IRIONDO, J M; TORRES, E. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. **Biological Conservation**, Beijing, v. 113, n. 3, p. 351-365, Oct. 2003.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: SBG, 1992. 631p.

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D; VENCOVSY,R. Genetic structure, mating system, and log-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**. Washington, v. 94, n. 5, p. 399-406, Sept. 2003.

GANDARA, F.B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Campinas. Campinas, 1996.

GONZALES, E.; HAMRICK, J.L. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum*. **Heredity**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 306-314, Dec. 2005.

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**. Dordrecht: Junk Publishers, 1986. chap. 17, p. 211-223.

HAMRICK, J. L.; SCHNABEL, A. Understanding the genetic structure of plant populations: Some old problems and a new approach. In: GREGORIOUS, H.R. (Ed.). **Population Genetics in Forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. chap. 1, p. 50-70.

HAMRICK, J.L., MURAWSKI, D.A.; NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 107/108, n. 1, p. 281-297, June 1993.

HARDY, O,J; VEKEMANS, X. Spagedi: a versatile computer program to analyses spatial genetics structure at the individuals or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.2, n. 4, p. 618-620, Dec. 2002.

KALISTZ, S.; NASON, J.D.; HANZAWA, F.M. TONSOR, S.J. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating history and selection. **Evolution**, Lawrence, v. 55, n, 8, p. 1560-1568, Ago. 2001.

KLIMAS, C. A. **Ecological review and demographic study of *Carapa guianensis***. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade da Florida, Florida-EUA, 2006.

LEGENDRE, P. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? **Ecology**, Washington, v. 74, n. 6, p. 1659-1673. Sept. 1993.

LOISELLE, B.A.; SORK VL, NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, Nov. 1995.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 326p

- MACHADO, F.R.B.; VINSON, C.C.; SILVA, V.P.; CIAMPI, A.Y. Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53., 2002, Recife. **Resumo...** Recife: SSB. 2002. p. 79-80. Resumo 0251.
- MARSHALL, T.C.; SLATE J.; KERUUK L.E.B.; PEMBERTON, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 639-655, May 1998.
- MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 7, n. 6, p. 957-969, Dec. 2006.
- MEAGHER, T.R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. **The American Naturalist**, Provo, v. 128, n. 2, p. 199-215. Ago. 1986.
- MORAES, P.L.R.; MONTEIRO, R.; VENCOSKY, R. Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 475-487, jun. set. 2004.
- NG, K.K.S.; LEE, S.L.; KOH, C.L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, n.13, v. 3, p. 657-669, Mar. 2004.
- NG, K.K.S.; LEE, S.L.; SAW, L.G.; PLOTKIN, J.B.; KOH, C.L. Spatial structure and genetic diversity of three tropical tree species with different habitat preferences within a natural forest. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 2, n. 3, p. 121-131, July 2006.
- ODDOU-MURATORIO, S.; DEMESURE-MUSCH, B. PÉLISSER, R; GOUYON, P. Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sobus torminalis*. L. Crants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 3689-3702, Oct. 2004.
- PÓVOA, J. S.R. **Distribuição da variação genética de *Cederela fissilis* Vell. em fragmentos florestais no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas.** 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SATO, T.; ISAGI, Y.; OSUMI, K. GOTO, S. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 79-84, Jan. 2006.

VINSON, C.C.; AZEVEDO, V.C.R.; SAMPAIO, I; CIAMPI, A.Y. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 33-34, Mar. 2005.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 148p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

Anexo

Tabela 1 – Frequência de alelos por loco de *Carapa guianensis* na população Rio Branco e nos ambientes de terra firme e baixo dentro desta população

(continua)

População total				Ambiente de terra firme				Ambiente de baixo			
Locos	P	J	A	Locos	P	J	As	Locos	P	J	A
Cg 01				Cg 01				Cg 01			
(n)	448	249	257	(n)	215	115	89	(n)	233	134	168
170	0,001	-	-	170	0,002	-	-	196	0,004	-	-
174	0,001	-	-	174	0,002	-	-	198	0,002	-	0,003
180	-	0,002	-	180	-	0,004	-	200	0,798	0,896	0,869
186	0,002	-	0,002	186	0,005	-	0,006	202	0,000	0,007	0,000
188	0,002	0,008	-	188	0,005	0,017	-	204	0,195	0,097	0,128
196	0,008	-	0,002	196	0,012	-	0,006				
198	0,007	0,002	0,002	198	0,012	0,004	-				
200	0,759	0,803	0,807	200	0,716	0,696	0,691				
202	0,001	0,008	0,004	202	0,002	0,009	0,011				
204	0,219	0,177	0,183	204	0,244	0,270	0,287				
Cg 06				Cg 06				Cg 06			
(n)	448	249	257	(n)	216	115	89	(n)	232	134	168
132	-	-	0,004	138	-	0,009	-	132	-	-	0,006
138	-	0,008	0,002	140	0,194	0,200	0,202	138	-	0,007	0,003
140	0,199	0,255	0,288	142	0,782	0,757	0,764	140	0,203	0,302	0,333
142	0,789	0,719	0,683	150	0,016	0,030	0,011	142	0,795	0,687	0,640
150	0,009	0,014	0,006	154	0,007	0,004	0,022	150	0,002	-	0,003
154	0,003	0,002	0,014					154	-	-	0,009
156	-	0,002	0,004					156	-	0,004	0,006

Tabela 1 – Frequência de alelos por loco de *Carapa guianensis* na população Rio Branco e nos ambientes de terra firme e baixo dentro desta população

(continuação)

População total				Ambiente de terra firme				Ambiente de baixo			
Locos	P	J	A	Locos	P	J	As	Locos	P	J	A
Cg 12				Cg 12				Cg 12			
(n)	444	248	256	(n)	210	114	88	(n)	234	134	168
145	-	-	0,002	151	0,040	0,039	0,028	145	-	-	0,003
151	0,021	0,024	0,020	153	0,369	0,360	0,352	151	0,004	0,011	0,015
153	0,409	0,397	0,404	155	0,057	0,193	0,210	153	0,444	0,429	0,432
155	0,047	0,099	0,092	157	0,533	0,399	0,403	155	0,038	0,019	0,030
157	0,521	0,476	0,480	159	-	0,004	0,006	157	0,511	0,541	0,521
159	0,001	0,002	0,002	165	-	0,004	-	159	0,002	-	-
165	-	0,002	-								
Cg 16				Cg 16				Cg 16			
(n)	448	248	257	(n)	216	115	89	(n)	233	133	168
153	-	-	0,002	157	0,005	-	-	153	-	-	0,003
157	0,008	-	0,002	159	0,100	0,083	0,124	157	0,011	-	0,003
159	0,080	0,063	0,086	163	0,215	0,187	0,197	159	0,063	0,045	0,065
163	0,220	0,200	0,193	165	0,132	0,183	0,124	163	0,224	0,211	0,190
165	0,206	0,218	0,218	167	0,257	0,230	0,236	165	0,276	0,248	0,268
167	0,188	0,185	0,171	169	0,139	0,143	0,169	167	0,123	0,147	0,137
169	0,108	0,133	0,126	171	0,148	0,174	0,152	169	0,080	0,124	0,104
171	0,175	0,159	0,136	173	0,005	-	-	171	0,200	0,147	0,128
173	0,015	0,018	0,029					173	0,024	0,034	0,045
175	-	0,004	0,016					175	-	0,008	0,024
177	-	0,014	0,010					177	-	0,026	0,015
179	-	0,004	0,010					179	-	0,008	0,015
181	-	0,002	-					181	-	0,004	-
183	-	-	0,002					183	-	-	0,003

Tabela 1 – Frequência de alelos por loco de *Carapa guianensis* na população Rio Branco e nos ambientes de terra firme e baixo dentro desta população

(continuação)

População total				Ambiente de terra firme				Ambiente de baixo			
Locos	P	J	A	Locos	P	J	As	Locos	P	J	A
Cg 17				Cg 17				Cg 17			
(n)	444	249	257	(n)	213	115	89	(n)	231	134	168
199	-	0,004	0,006	199	-	0,009	0,017	203	-	-	0,006
203	-	-	0,004	209	0,007	-	-	205	-	0,004	-
205	-	0,002	-	211	0,070	0,061	0,056	211	0,037	0,030	0,030
209	0,003	-	-	213	0,462	0,609	0,545	213	0,487	0,474	0,482
211	0,053	0,044	0,039	215	0,308	0,230	0,298	215	0,385	0,407	0,414
213	0,475	0,536	0,504	217	0,138	0,091	0,067	217	0,074	0,060	0,063
215	0,348	0,325	0,374	219	0,002	-	-	219	0,002	-	-
217	0,105	0,074	0,064	221	0,002	-	-	221	0,015	0,011	0,006
219	0,002	-	-	225	0,002	-	-	225	-	0,007	-
221	0,009	0,006	0,004	227	0,005	-	-	227	-	0,007	-
225	0,001	0,004	-	229	-	-	0,011				
227	0,002	0,004	-	231	-	0,006	-				
229	-	-	0,004	235	0,002	-	-				
231	-	-	0,002								
235	0,001	-	-								
Cg 05p				Cg 05p				Cg 05p			
(n)	439	244	253	(n)	212	114	88	(n)	227	130	165
168	-	0,002	0,002	170	0,012	0,018	-	168	-	0,004	0,003
170	0,010	0,014	-	172	0,066	0,140	0,108	170	0,009	0,012	-
172	0,107	0,109	0,089	174	0,276	0,276	0,227	172	0,145	0,081	0,079
174	0,270	0,225	0,253	176	0,368	0,272	0,386	174	0,267	0,181	0,267
176	0,313	0,320	0,296	178	0,038	0,044	0,045	176	0,262	0,362	0,248

Tabela 1 – Frequência de alelos por loco de *Carapa guianensis* na população Rio Branco e nos ambientes de terra firme e baixo dentro desta população

(continuação)

População total				Ambiente de terra firme				Ambiente de baixo			
Locos	P	J	A	Locos	P	J	As	Locos	P	J	A
Cg 05p				Cg 05p				Cg 05p			
(n)	439	244	253	(n)	212	114	88	(n)	227	130	165
178	0,059	0,064	0,055	180	0,179	0,219	0,188	178	0,079	0,081	0,061
180	0,153	0,195	0,192	184	0,033	0,018	0,023	180	0,128	0,173	0,194
182	-	0,012	0,006	192	0,024	0,009	-	182	-	0,023	0,009
184	0,067	0,047	0,085	202	0,005	-	0,023	184	0,099	0,073	0,118
186	-	0,002	-	204	-	0,004	-	186	-	0,004	-
190	0,001	-	0,004					190	0,002	-	0,006
192	0,011	0,006	0,004					192	-	0,004	0,006
202	0,005	0,002	0,010					202	0,004	0,004	0,003
204	0,002	0,002	0,004					204	0,004	-	0,006
Cg 07p				Cg 07p				Cg 07p			
(n)	448	249	257	(n)	215	115	89	(n)	233	134	168
198	0,001	-	-	198	0,002	-	-	202	0,002	-	0,003
202	0,001	-	0,002	204	0,002	-	-	214	-	0,004	-
204	0,001	-	-	214	0,016	0,009	-	216	0,474	0,433	0,423
214	0,008	0,006	-	216	0,542	0,639	0,607	218	0,019	0,030	0,030
216	0,507	0,528	0,486	218	0,030	0,004	0,017	220	0,167	0,164	0,170
218	0,025	0,018	0,025	220	0,112	0,096	0,079	222	0,002	0,004	0,012
220	0,141	0,133	0,138	222	0,002	0,004	0,006	224	0,009	0,011	0,003
222	0,002	0,004	0,010	224	0,014	0,013	0,006	226	0,133	0,123	0,098
224	0,011	0,012	0,004	226	0,044	0,043	0,067	228	-	-	0,006
226	0,090	0,086	0,088	228	0,002	-	-	230	0,045	0,056	0,054
228	0,001	-	0,004	230	0,033	0,030	0,022	232	0,114	0,138	0,170
230	0,039	0,044	0,043	232	0,149	0,130	0,140	234	0,032	0,034	0,033

Tabela 1 – Frequência de alelos por loco de *Carapa guianensis* na população Rio Branco e nos ambientes de terra firme e baixio dentro desta população

(conclusão)

População total				Ambiente de terra firme				Ambiente de baixio			
Locos	P	J	A	Locos	P	J	As	Locos	P	J	A
Cg 07p				Cg 07p				Cg 07p			
(n)	448	249	257	(n)	215	115	89	(n)	233	134	168
232	0,131	0,135	0,160	234	0,044	0,030	0,045	238	-	0,004	-
234	0,038	0,032	0,037	248	0,005	-	0,011	254	0,002	-	-
238	-	0,002	-	252	0,002	-	-				
248	0,002	-	0,004								
252	0,001	-	-								
254	0,001	-	-								