

Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae.

VÂNIA CRISTINA RENNÓ AZEVEDO

Brasília DF
20 de Março 2007

Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae.

VÂNIA CRISTINA RENNÓ AZEVEDO

Orientador: DARIO GRATTAPAGLIA

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Brasília DF
20 de Março 2007

À Deus,

Aos meus pais, Ana Maria Rennó e Hércio Azevedo (em memória),

Aos meus irmãos Elisa e Guilherme,

DEDICO

*"Os poderosos podem matar uma, duas, até três rosas,
mas nunca deterão a primavera!"*

Tche Guevara (1928-1967)

*"O homem de bem exige tudo de si próprio;
o homem medíocre espera tudo dos outros"*
Confúcio (551-479a.C.)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que nos guarda, protege e inspira sem o qual nenhum ser vivo existiria e sem o qual a vida não faz sentido.

À minha mãe Ana Maria Rennó, meu pai Hércio Azevedo (em memória), meus irmãos Elisa e Guilherme, pelo apoio incondicional, confiança, amizade e carinho. E a toda a minha enorme família, avós, tios e primos que mesmo distantes torcem por mim.

* * *

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Biologia Celular, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o doutorado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de poder executar o trabalho de tese em suas instalações.

À Embrapa Amazônia Oriental, sede do Projeto Dendrogene, pela oportunidade de poder fazer parte dessa idéia, contribuindo para o uso sustentável dos nossos recursos; ao IBAMA e ao DFID (Departamento para Desenvolvimento Internacional, Reino Unido) pelo apoio ao projeto, suporte financeiro, técnico e administrativo.

À pesquisadora Dra. Ana Yamaguishi Ciampi pela orientação, receptividade e amizade durante todo o trabalho.

Ao pesquisador e professor Dr. Dario Grattapaglia pela colaboração e orientação.

Ao coordenador do Projeto Dendrogene, Dr. Milton Kanashiro, ao Ian Thompson e todos os pesquisadores que contribuem com essa idéia, em especial aos pesquisadores Dr. Bernd Degen, Dr. David Boshier, Dra. Marylinn Loveless, Dr. Alexandre M. Sebbenn pelas discussões, sugestões e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

À todos os pesquisadores e funcionários do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Dra. Gláucia Buso, Dr. Márcio Moretzsohn, Marília Pappas, Dr. Marcio Elias Ferreira, Zilneide Amaral (Neide), Marco Antônio (Marcão) por terem sempre se mostrado receptivos em ajudar em tudo que fosse preciso.

Ao professor Dr. Alexandre Coelho por ter sido sempre tão prestativo e pronto a ajudar nos momentos de dúvidas.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular, em especial à professora Dra. Cynthia Maria Kyaw, por todo o ensino, amizade e pela contribuição na minha formação científica.

À secretária do departamento de Biologia Celular, Ana pela dedicação e compromisso.

* * *

A todos os colegas do laboratório de Genética Vegetal pelo apoio, ajuda e cooperação, Andréa Raposo, Karina Martins, Eva Mamaní, Yamá Castilho, Marco Pessoa, Rodrigo Lourenço, Juliano Pádua, Alexandre Missiaggia, Manuela Alegria, Elisabete Nunes (Bete), Natália, Patrícia, Larissa, Andréa Schmidt, Bruna, Sandra, em especial à minha afilhada Tályta Nayza Almeida e ao Valci Pereira da Silva que tanto me ajudaram nessa caminhada.

A todos os amigos do projeto Dendrogene, Dra. Marivana Silva, Dr. Dominic Cloutier, Dr. André Lacerda, Romy Sato, Luke Watson, Licurgo, Francimeire e em especial à querida amiga Christina Vinson, por toda a ajuda, amizade e confiança sempre.

Às amigas que compõe a querida irmandade, Ana Luiza Lacerda, Andrielle Amaral, Flavia Machado, Christina Vinson (de novo), Flavia Xavier, Joema Póvoa, Clarissa Falcão, Daniele Scandiucci, companheiras de laboratório e dos momentos de farra, e a todos os associados desse querido grupo de amigos.

E a todos que mesmo não citados aqui são também muito importantes para mim.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Conservação de espécies arbóreas tropicais.....	3
Amazônia – manejo e conservação dos recursos genéticos.....	5
A espécie <i>Manilkara huberi</i>	7
Marcadores moleculares.....	9
Desenvolvimento de SSRs e conservação dos locos.....	15
Sistemas semi-automatizados de genotipagem utilizando SSRs.....	17
A estrutura genética de populações de plantas.....	18
Marcador molecular citoplasmático – cpDNA.....	24
INTRODUÇÃO GERAL.....	26
OBJETIVOS GERAIS.....	27
CAPÍTULO 01:	
Desenvolvimento e otimização de marcadores moleculares microssatélites para a espécie <i>Manilkara huberi</i> (Ducke) A.Chev. e transferibilidade para a espécie <i>M. multifida</i>	
RESUMO.....	29
INTRODUÇÃO.....	30
OBJETIVOS.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
Área de estudo, material vegetal e extração de DNA.....	34
Construção da biblioteca genômica enriquecida.....	34
Seleção da enzima de restrição para digestão do DNA.....	36
Ligação do DNA aos adaptadores e ligação de biotina aos oligonucleotídeos.....	37
Preparo das contas magnéticas para hibridização.....	37
Hibridização do DNA+adaptador ao complexo Bio-oligos-contas.....	38
PCR para controle do enriquecimento da biblioteca.....	39
Análise de <i>Southern blot</i> com sonda poli AG/TC.....	39

Ligação do DNA ao plasmídeo pGEM-T, transformação e repicagem de colônias.....	40
Seleção dos clones positivos.....	41
PCR e reação de seqüenciamento.....	42
Desenho dos iniciadores e otimização dos locos SSR.....	43
Análise dos dados.....	45
Transferibilidade para a espécie <i>M. multifida</i>	46
RESULTADOS.....	48
Biblioteca genômica enriquecida para seqüências hiper-variáveis.....	48
Seqüenciamento de clones e triagem de pares de iniciadores.....	49
Análises estatísticas.....	55
Transferibilidade para a espécie <i>M. multifida</i>	56
DISCUSSÃO.....	58
Eficiência da metodologia utilizada.....	58
Detecção do polimorfismo e genotipagem.....	59
Análise dos dados.....	60
Transferibilidade para <i>M. multifida</i>	61
CONCLUSÃO.....	63
CAPÍTULO 02:	
Estrutura genética espacial, sistema de cruzamento e fluxo gênico em uma população natural de <i>Manilkara huberi</i> (Ducke) A.Chev.	
RESUMO.....	65
INTRODUÇÃO.....	66
OBJETIVOS.....	70
MATERIAL E MÉTODOS.....	71
Área de estudo, amostragem e material vegetal.....	71
Extração e quantificação de DNA.....	74
Sistema <i>primer tail</i> e otimização dos SSRs.....	74
Diversidade genética e índice de fixação.....	77
Estrutura genética espacial.....	78
Análise de fluxo gênico.....	80
Sistema de cruzamento.....	80
RESULTADOS.....	83
Otimização da reação de PCR.....	83

Frequências alélicas.....	83
Diversidade genética e índice de fixação.....	88
Desequilíbrio de HW e desequilíbrio de ligação.....	91
Estrutura genética espacial.....	92
Análise de fluxo gênico.....	94
Sistema de cruzamento.....	94
DISCUSSÃO.....	96
Diversidade genética e índice de fixação.....	96
Estrutura genética espacial.....	98
Sistema de cruzamento.....	99
Distância de fluxo de pólen.....	100
Conservação e manejo.....	102
CONCLUSÃO.....	106
CAPÍTULO 03:	
Análise da variabilidade no DNA de cloroplasto em <i>Manilkara huberi</i> (Ducke) A.Chev.	
RESUMO.....	108
INTRODUÇÃO.....	109
OBJETIVOS.....	113
MATERIAL E MÉTODOS.....	114
Área de estudo, amostragem e material vegetal.....	114
Extração e quantificação de DNA.....	114
Otimização de locos cpSSR.....	114
Seqüenciamento de DNA plastidial.....	116
Análise dos dados.....	118
cpSSR.....	118
Seqüenciamento.....	118
RESULTADOS.....	119
Diversidade haplotípica.....	119
Distribuição espacial dos haplótipos.....	121
Polimorfismo de seqüências.....	122
DISCUSSÃO.....	124
CONCLUSÃO.....	126

CAPÍTULO 04:

Impacto da exploração seletiva na diversidade genética de *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev. e geração de indicadores para o manejo sustentável da espécie

RESUMO.....	128
INTRODUÇÃO.....	129
OBJETIVOS.....	134
MATERIAL E MÉTODOS.....	135
Área de estudo e amostragem.....	135
Modelo de Simulação.....	135
Tamanho populacional.....	137
Taxa de crescimento.....	137
Densidade e mortalidade.....	138
Fertilidade e produção de sementes.....	138
Fenologia.....	138
Polinização.....	139
Dispersão de sementes.....	139
Manejo florestal.....	139
Genética.....	140
RESULTADOS.....	141
Número de indivíduos, área basal e produção de madeira.....	141
Impacto na variabilidade genética.....	143
DISCUSSÃO.....	147
CONCLUSÃO.....	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
ANEXO 01.....	167
Artigo 01.....	167
Artigo 02.....	174

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01

Tabela 1.1. Seqüência dos clones que geraram fragmentos polimórficos. As regiões em verde representam o local de desenho dos iniciadores e as seqüências em azul representam as seqüências SSR. O clones Mh03 e Mh24 são idênticos.

Tabela 1.2. Informações sobre os doze locos polimórficos, indicando o motivo repetitivo, a seqüência dos iniciadores, A se refere ao número de alelos, o tamanho de fragmento esperado de acordo com o Programa Primer3 e o número de acesso no Gene-Bank.

Tabela 1.3. Informações sobre 13 locos SSR de *M. huberi* com base na análise de 12 indivíduos.

Temperatura de anelamento (T_a °C), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), índice de fixação (f) e o intervalo de confiança a 95% , probabilidades de exclusão de paternidade ($Pr(Ex_1)$ e $Pr(Ex_2)$).

Tabela 1.4. Informações sobre os marcadores microsatélites transferidos estimadas de uma amostragem de 12 árvores.

Temperatura de anelamento (T_a), número total de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), probabilidades de exclusão de paternidade ($P_r(Ex_1)$ e $P_r(Ex_2)$)

CAPÍTULO 02

Tabela 2.1. Locos utilizados nas genotipagens das três gerações de *Manilkara huberi*.

Nº. de ind.: número total de indivíduos genotipados, A : número total de alelos, T_a (°C): temperatura de anelamento. Fluorocromo utilizado na marcação. Cor: cada fluorocromo de acordo com o filtro D.

Tabela 2.2. Alelos raros exclusivos a cada geração e suas freqüências.

Tabela 2.3. Estimativas obtidas da análise das três gerações de *Manilkara huberi* em cada loco.

n , número de indivíduos analisados; A , número de alelos; H_e , heterozigosidade esperada; $h_{máx}$, diversidade genética máxima possível; $\hat{H}_e/h_{máx}$, proporção da diversidade genética máxima possível; H_o , heterozigosidade observada e f , índice de fixação de alelos. Os valores Superior e Inferior representam o intervalo obtido com o teste de reamostragens do *bootstrap* (IC 99%).

Tabela 2.4. Estimativas obtidas para os grupos de *Manilkara huberi* separados de acordo com as classes diamétricas.

n , número de indivíduos analisados; \hat{A}_p , número médio de alelos polimórficos por classe; \hat{H}_e , heterozigosidade esperada; \hat{H}_o , heterozigosidade observada e \hat{f} , índice de fixação de alelos. Valores Superior e Inferior representam o intervalo obtido com o teste de reamostragens do *bootstrap* 95%.

Tabela 2.5. Resultados obtidos das comparações entre as gerações de *M. huberi* analisadas par a par. Valores de θ_p .

Valores médios de divergência genética entre as gerações (θ_p).

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Locos cpSSR utilizados nas análises da população de *M. huberi*.

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 Parâmetros definidos para todos os cenários testados.

DAP= diâmetro a altura do peito; *DP* = desvio padrão.

Tabela 4.2 Informações sobre os diferentes cenários simulados. Para cada cenário foram realizadas 100 repetições e os resultados considerados foram as medias aritméticas obtidas e seus desvios padrões.

Tabela 4.3. Quantidade de madeira retirada da floresta medida em área basal (m^2/ha) acumulativa. Ao final está representada a quantidade total de madeira retirada da floresta após 300 anos de exploração. A percentagem representa quanto de madeira é retirado da floresta em relação ao primeiro corte realizado (05 anos).

Tabela 4.4. Dados sobre características genéticas após simulações de 300 anos em cada cenário.

n , número de indivíduos; A , número de alelos, A_e , alelos efetivos; H_e , heterozigosidade esperada; H_o , heterozigosidade observada; f , índice de fixação de alelos na população; D , distância genética de Gregório e NG , número de combinações genotípicas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. **A)** Árvore de *Manilkara huberi* na FLONA Tapajós. Copa amarelada devido à cor da face abaxial de suas folhas. **B)** Polinizador. **C)** Frutos. (i) frutos jovens e detalhe da folha amarelada na face abaxial; (ii) frutos verdes; (iii) fruto maduro. **D)** Fases de abertura da flor: (i) fase feminina; (ii) fase masculina; (iii) pós-fertilização. **E)** Troncos de *M. huberi*. (i) base de uma árvore recém cortada; (ii) toras após o corte. **A e B** – Fotos de Márcia Maués. **C, D e E** - Fotos da coleção espécies arbóreas da Amazônia, Projeto Dendrogene.

Figura 02. Modelos de fluxo gênico. **A)** Modelo continente-ilha; **B)** Modelo de ilhas; **C)** modelo de alpondras e **D)** Modelo de isolamento por distância.

CAPÍTULO 01

Figura 1.1. Esquema do processo de construção de biblioteca genômica enriquecida para seqüências SSR. **A)** Digestão do DNA com enzima de restrição; **B)** Recuperação dos fragmentos entre 200 e 800 pb; **C)** Ligação de adaptadores aos fragmentos de DNA; **D)** Ligação de biotina aos oligos TC₁₃; **E)** Hibridização de streptavidina à biotina; **F)** Hibridização dos oligos ao DNA; **G)** Recuperação dos fragmentos que contém SSR; **H)** PCR para confirmação do enriquecimento e recuperação da dupla fita de DNA; **I)** Ligação do DNA ao vetor pGEM-T; **J)** Transformação em *E. coli*, repicagem e seleção de clones por hibridização; **L)** PCR e reação de sequenciamento; **M)** Desenho de iniciadores, otimização dos locos e detecção de polimorfismo.

Figura 1.2. **A)** Seleção da enzima de restrição. O marcador utilizado na primeira linha é o Φ 174. **B)** Digestão de 50 μ g de DNA com *Tsp509 I*, Ladder 1Kb utilizado como marcador. **C)** Quantificação da eluição dos fragmentos de 200 a 800pb. Foram utilizados como marcadores de peso molecular λ DNA (200 ng) (primeira pista) e Ladder 1Kb (última pista).

Figura 1.3. Esquema do aparato magnético utilizado para precipitar as contas magnéticas para a retirada do sobrenadante sem prejuízo de perda de DNA. As contas são atraídas pelo ímã da estante e ficam no fundo do tubo.

Figura 1.4. Resultado da reação de PCR para controle do enriquecimento. As amplificações ocorreram nas reações cujos *templates* eram o DNA controle (tubo 1) e onde estava o complexo Bio-oligos-contas-DNA (tubo 7). As setas azuis indicam o marcador Ladder Kb.

Figura 1.5. Desenho esquemático do vetor pGEM-T mostrando o *poli-linker* onde o fragmento é inserido. A inserção do fragmento implica na inativação do gene *lacZ* e formação de colônias brancas, incapazes de metabolizar o X-gal.

Figura 1.6. Quantificação da reação de PCR do inserto pré-reação de seqüenciamento. O produto desta PCR é purificado e utilizado como *template* na reação de seqüenciamento. As setas azuis indicam o marcador Ladder 1Kb, e as vermelhas o padrão de peso molecular λ DNA (200ng). A partir da terceira linha as reações de PCR das colônias positivas.

Figura 1.7. Imagem de uma eletroforese de seqüenciamento em ABI 377. Representa o primeiro passo nas análises das seqüências para um posterior desenho de iniciadores.

Figura 1.8. Programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) para desenho de iniciadores nas regiões que flanqueiam o SSR. Dados importantes: **tm** temperatura de *melting* de cada iniciador - é ideal que a diferença de temperatura entre os iniciadores não seja maior que 3°C; **gc%** não deve ser inferior a 40%; * se refere ao alvo, o SSR; >>> seqüência do iniciador *forward*; <<< complementar da seqüência do iniciador *reverse*.

Figura 1.9. **A)** Exemplo de transformação de células competentes de *E. coli*. As colônias brancas representam os clones positivos que foram repicados em duas novas placas. **B)** Resultado de *Southern blot*. Imagem do filme ao qual foi exposta a membrana hibridizada com sonda TC₁₃. Os pontos escuros representam colônias positivas.

Figura 1.10. Eletroferogramas de seqüências que contém SSR. **A)** SSR perfeito. **B)** SSRs de outra classe, (GAACA). **C)** Diminuição de intensidade logo após o SSR dificultando o desenho de iniciadores. **D)** Exemplo de um SSR composto TA/GA, forma também comumente encontrada.

Figura 1.11. Géis desnaturantes de poliacrilamida 4% corados com nitrato de prata. **A)** Locos, Mh06, Mh07, Mh08 e Mh09 (Ta=56°C). **B)** Loco Mh 03 (Ta=56°C). Loco Mh24 (Ta= 60°C). **C)** Locos Mh10 e Mh12 (Ta=56°C). **D)** Locos Mh15, Mh16, Mh17 e Mh18 (Ta=56°C). **E)** Locos Mh19, Mh20, Mh22 e Mh24 (Ta=56°C). Mh24 apresentou bandas inespecíficas à 56°C. Locos polimórficos foram selecionados para os estudos populacionais. As setas superiores indicam o marcador Ladder 10 pb.

Figura 1.12. Gel desnaturante de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata da transferibilidade para *M. multifida*.

CAPÍTULO 02

Figura 2.1: Localização da área estudada na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA Tapajós), Pará, Brasil. Fonte: Nasa, 2001.

Figura 2.2. Mapa da área de 200 hectares estudada. Cada retícula representa 1 hectare. Os círculos azuis representam as árvores genotipadas, e os círculos rosa representam as árvores maternas a partir das quais as sementes foram coletadas.

Figura 2.3. Esquema do sistema de iniciador *tail*. A partir do segundo ciclo da reação de PCR são gerados fragmentos que contém a seqüência complementar ao iniciador marcado e a partir do terceiro ciclo são gerados os fragmentos que contém a marcação e que vão ser detectados no seqüenciador.

Figura 2.4. Exemplos de genotipagem de indivíduos adultos de *M. huberi* utilizando o sistema *multiplex* com três locos distintos, em analisador automático de fragmentos ABI 377. As bandas vermelhas representam o marcador interno ROX.

Figura 2.5. Distribuição das freqüências alélicas dos oito locos analisados na população adulta.

Figura 2.6. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população regenerante.

Figura 2.7. Distribuição das frequências alélicas da geração dos 810 descendentes de 27 árvores maternas da população adulta de *M. huberi*.

Figura 2.8. Correlograma do índice *I* de Moran para 10 classes de distância na população natural de *M. huberi*.

Figura 2.9. Representação gráfica do coeficiente de coancestria de acordo com Loiselle *et al.*, 1995 para 10 classes de distância na população natural de *M. huberi*.

CAPÍTULO 03

Figura 3.1. Distribuição dos 96 indivíduos de *M. huberi* selecionados para as análises de polimorfismo de seqüência de cpDNA. Cada retícula equivale a 1 ha.

Figura 3.2. Exemplos das análises de cpSSR. A) Loco ccmp10, sem variação haplotípica; B) Loco ccmp01, com variação haplotípica.

Figura 3.3. Correlograma do índice *I* de Moran para 19 classes de distância na população natural de *M. huberi*.

Figura 3.4. Histograma do coeficiente de coancestria de acordo com Loiselle *et al.* (1995) para 10 classes de distância na população natural de *M. huberi*.

Figura 3.5. Exemplos de alinhamentos de seqüências idênticas de cpDNA de *M. huberi*.

CAPÍTULO 04

Figura 4.1: Fluxograma de uma simulação com Eco-Gene (Degen & Watson, 2004 – adaptado).

Figura 4.2. Tempo de recuperação da área basal de *M. huberi* após um único corte sob padrões do manejo florestal sustentável regulamentar.

Figura 4.3. Quantidade de madeira retirada da floresta em cada ciclo em cada cenário testado.

RESUMO

Marcadores microssatélites têm sido utilizados com grande frequência como uma ferramenta efetiva para estudos de estrutura genética de populações, fluxo gênico, parentesco e para quantificar os efeitos da fragmentação de habitats e guiar estratégias de conservação. Como parte do Projeto de Dendrogene nosso interesse está centrado na conservação e na definição de estratégias de manejo de árvores madeireiras da floresta amazônica. Este trabalho tem como objetivo estudar a diversidade e a estrutura genética de uma população natural de *Manilkara huberi*, conhecida como maçaranduba, usando marcadores microssatélites. Aliado a isso, avaliar a variabilidade do cpDNA e por estudo de modelagem avaliar o potencial efeito da exploração na estrutura genética populacional. Esta espécie é intensamente explorada pela indústria madeireira devido à alta densidade de sua madeira. Treze locos microssatélite altamente polimórficos foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para repetições de AG/TC. Os níveis de polimorfismo foram avaliados utilizando-se um total de 12 árvores adultas provenientes de uma população natural. Para os estudos de estrutura genética de populações, foram amostradas 481 árvores adultas, 88 regenerantes e 810 descendentes de uma população natural na FLONA Tapajós, PA, Brasil. Todos os indivíduos foram genotipados com sete locos microssatélites altamente polimórficos utilizando detecção fluorescente. Para adultos, regenerantes e descendentes respectivamente as seguintes estimativas foram obtidas: $H_e = 0,867, 0,840$ e $0,811$. Os índices de fixação para as três gerações foram significativamente diferentes de zero ($f = 0,221, 0,303$ e $0,237$), porém não estatisticamente diferentes entre si (IC 95%). A divergência genética (θ_p) entre as três gerações foi baixa para a média dos locos (0,018), mas consistente (IC 95%). A análise de distribuição espacial de genótipos detectou a existência de estruturação genética espacial significativa a uma distância de aproximadamente 450 metros de raio. As análises com marcadores de cpDNA confirmam a presença de estruturação. A taxa de cruzamento multiloco (t_m) estimada foi de 0,995, indicando que a espécie é preferencialmente alógama e com fluxo de pólen restrito (49,5 m). Os resultados sugerem padrão de isolamento por distância e que programas de manejo e conservação *in situ* devem incluir grandes áreas e evitar a fragmentação. As análises genéticas revelaram ainda que para conservação *ex situ*, sementes devem ser coletadas de pelo menos 188 árvores maternas para que seja preservado um tamanho efetivo de 500. Como a espécie é espacialmente estruturada e de ampla distribuição, a distância mínima entre as árvores deve ser de 500 m. Os resultados obtidos indicam que a estrutura genética desta espécie está associada aos padrões de reprodução e demografia da população. Em análises de modelagem, a *M. huberi* necessitaria de 130 anos para recuperar a sua área basal original, considerando-se as recomendações atuais permitidas por lei, deixando evidente a insustentabilidade dos atuais ciclos de 30 anos recomendados para programas de manejo. Torna-se claro o entendimento crescente da biologia das espécies para uma redefinição de políticas públicas mais eficientes em relação à sustentabilidade da exploração madeireira e ao uso e conservação dos recursos florestais a longo prazo. Estas informações sobre a estrutura genética de *M. huberi* devem ser utilizadas para o planejamento adequado de práticas de manejo sustentável de populações da espécie na Floresta Amazônica Brasileira.

Palavras-chave: *Manilkara huberi*, Sapotaceae, SSR, diversidade genética, estrutura genética espacial, fluxo gênico, sistema de cruzamento.

ABSTRACT

Microsatellite markers have been increasingly used as an effective tool for understanding population genetic structure, gene flow, parentage and to quantify the effects of habitat fragmentation and to guide conservation strategies. As part of the Dendrogene Project we are interested in the conservation and management strategies of timber trees from the Amazonian forest. This research aims to study the genetic diversity and population genetic structure of a natural population of *Manilkara huberi*, known as maçaranduba, using microsatellite markers. We also aim to study the cpDNA variability and by modeling analysis to examine the potential effects of forest logging on the population genetic diversity. This species is intensely exploited by the timber industry due to the high density of its timber. Thirteen highly polymorphic loci were developed from a genomic library enriched for AG/TC repeats. Polymorphisms levels were evaluated using a total of twelve individuals. For population genetic studies 481 adults trees, 88 plantules and 810 seedlings were sampled from an area at a natural population at FLONA Tapajós, PA, Brazil. All individuals were genotyped at seven highly polymorphic microsatellite loci using fluorescence detection technology. For the adults, plantules and the seedlings the following estimates were obtained: expected heterozygosity $H_e = 0.867, 0.840$ and 0.811 . The fixation index for the three generations were high and significantly different from zero ($f = 0.221, 0.303$ and 0.237). The genetic divergence (θ_p) among the three generations was low for the mean over loci (0.018), but consistent (CI 95%). A spatial autocorrelation analysis detected the existence of significant spatial genetic structure at a radius of approximately 450 meters. That spatial structure was confirmed by the analysis based on cpDNA. The multilocus (t_m) population outcrossing rate was high (0.995), suggesting that the species is predominantly allogamous, and its pollen flow is restricted to 49.5 m. The results fit into isolation by distance pattern and suggest that *in situ* conservation management programs should include large areas, avoiding fragmentation. The genetic data also reveal that for *ex situ* conservation, seeds must be collected from at least 188 maternal trees in order to keep an effective population size of 500 individuals. As the species is spatially structure and shows high distribution, the minimum distance among maternal trees should be 500 m. The results obtained indicate that the genetic structure of this species is associated with patterns of reproduction and demography within populations. The modelling analysis indicate that *M. huberi* needs about 130 years to recover the original basal area after a exploitation under the conditions recommended by law. The results show that the actual cutting cycle of 30 years, applied in management programs is unsustainable. The knowledge about the species biology is evident in order to apply efficient public policy in relation to the wood exploitation and the use and conservation of forest resources. This information about *M. huberi* genetic structure should be used to guide sustainable management program of the species in the Brazilian Amazon Forest.

Key words: *Manilkara huberi*, Sapotaceae, SSR, genetic diversity, spatial genetic structure, gene flow, mating system.

REVISÃO DE LITERATURA

Conservação de espécies arbóreas tropicais

A preocupação com as conseqüências da degradação dos diversos ecossistemas vem sendo objeto de discussões e estudos nos últimos anos, tanto por parte de instituições governamentais, quanto pela comunidade científica (Telles, 2000). A perda de diversidade de espécies nas regiões tropicais, pela fragmentação e destruição de habitats tem sido alvo principal de discussões, entretanto, pouco ainda se sabe sobre a perda de diversidade genética (Rajora *et al.*, 2000). Neste sentido, atitudes vêm sendo tomadas com o objetivo de quantificar esse impacto e definir estratégias de conservação adequadas para ecossistemas em intensa exploração.

A conservação *in situ* de recursos genéticos tem sido considerada a forma mais efetiva, principalmente para os casos em que toda uma comunidade de espécies está sendo o objetivo da conservação, como os de programas com espécies florestais tropicais, onde todas as espécies, não só as de valor comercial estão envolvidas, assim como seus polinizadores, dispersores de sementes e predadores. Vale ressaltar que para a conservação *in situ* é importante que se conheçam geneticamente as espécies, não bastando que só se mantenha intocada a área onde as espécies em conservação estão vegetando (Kageyama *et al.*, 2002). Estratégias de conservação *in situ* devem ser desenvolvidas com base no conhecimento dos padrões de dispersão de pólen e sementes e da capacidade de regeneração da espécie.

De acordo com Putz *et al.* (2000), parques e áreas protegidas são essenciais para a conservação de biodiversidade, porém inadequados no sentido de assegurar a existência continuada da maioria das paisagens naturais, ecossistemas, comunidades, espécies e genótipos em florestas tropicais, caso um estudo aprofundado sobre as espécies em preservação não seja realizado.

Um amplo conhecimento das características demográficas, da dinâmica populacional (Matos *et al.*, 1999) e da genética da espécie (Reis *et al.*, 1997, Ciampi *et al.*, 2000) são fundamentais para a conservação pelo manejo sustentável. No entanto o componente genético, que é o fator responsável pelas diferenças em produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos de uma mesma espécie não tem sido considerado nos programas de manejo de florestas tropicais (Sebbenn *et al.*, 2000a). Estudos genéticos de espécies arbóreas manejadas com o objetivo de avaliar o impacto que a exploração pode ter causado e pode vir a causar são fundamentais, podendo-se definir estratégias de manejo adequadas para cada espécie que permitam a conservação da maior diversidade genética possível.

Processos demográficos (como fertilidade, mortalidade e recrutamento) e taxas de crescimento são dois atributos funcionais que podem ser considerados importantes componentes da biodiversidade de espécies que sofrem com a exploração (Putz *et al.*, 2000), e está de acordo com o que foi descrito por Carvalho *et al.* (2004) que mostraram que a taxa de crescimento das árvores comerciais é incrementada até cerca de 10 anos após a exploração. No entanto o fator genético é o componente mais sensível ao desmatamento (Putz *et al.*, 2000), e é o componente chave da sustentabilidade dos recursos florestais (Rajora *et al.*, 2000). Conhecer a distribuição da variação genética dentro e entre populações é importante porque pode prover descobertas relativas à história de uma população, uma vez que os atuais níveis e a distribuição da variação genética podem influenciar o sucesso futuro de populações (Erickson *et al.*, 2004).

Fatores evolucionários, tais como seleção e deriva genética podem trazer importantes conseqüências para a estrutura genética de populações, afetando sua dinâmica. Entretanto, a magnitude destes efeitos nos padrões de variação genética é dependente da habilidade reprodutiva dos indivíduos da população e do seu impacto no fluxo gênico. Estudos de sistemas de cruzamento e de dispersão de pólen e de sementes são estratégias de investigação

do fluxo de alelos e dos níveis de diversidade genética dentro de populações (Nason & Hamrick, 1997).

Amazônia – manejo e conservação dos recursos genéticos

A Floresta Amazônica cobre cerca de 40% do território nacional e se constitui numa das maiores reservas mundiais de biodiversidade. Estima-se que a área coberta com floresta densa de terra-firme tenha sido em torno de 3.303.000 km² (Braga, 1979). No total estima-se que existem entre 4.000 e 5.000 espécies arbóreas na Amazônia (Rodrigues, 1989) *apud* (Ferraz *et al.*, 2004) e uma série delas é explorada comercialmente por meio de extração seletiva devido ao seu valor madeireiro. Contudo, a exploração ao longo das décadas tem se dado de forma irracional, insustentável causando prejuízos ao país e especialmente ao meio ambiente.

Essa exploração teve início há três séculos, no entanto somente nas últimas três décadas a Amazônia assumiu a liderança em produção de madeira no país o que se deve principalmente ao fato da exaustão das florestas do sul e sudeste do país. Neste sentido é provável que estejamos apenas no início de uma grande era de exploração madeireira na Amazônia (Veríssimo *et al.*, 1996).

A exploração madeireira da região é baseada na atividade extrativista que constitui na retirada de produtos da floresta primária ou não-plantada para uso pessoal ou comercial. Com esse tipo de economia não haveria uma necessidade imediata de informações básicas sobre ecologia e o cultivo de espécies madeireiras. Entretanto, com a intensificação da exploração essas informações se tornam cada vez mais necessárias (Ferraz *et al.*, 2004).

O Decreto que regulamentou a exploração das florestas da Bacia Amazônica (Decreto nº 1.282, de 19.10.1995) definiu o manejo florestal sustentável como a administração de uma floresta para a obtenção de benefícios sociais, respeitando-se os mecanismos de sustentação

do ecossistema. No entanto o que se observa é que o manejo florestal promovido é arbitrário com relação às espécies, como se todas fossem iguais e afetadas da mesma maneira e intensidade pela exploração seletiva.

Em virtude da carência de informações biológicas nos planos de manejo florestal e da preocupação com a manutenção da diversidade genética inter e intraespecífica, iniciativas estão sendo tomadas no sentido de integrar conhecimento científico sobre diversas informações biológicas com o objetivo de garantir a sustentabilidade produtiva da floresta a longo prazo. Uma dessas iniciativas foi tomada pela EMBRAPA Amazônia Oriental por meio do Projeto Dendrogene (*Conservação Genética das Florestas Manejadas da Amazônia*) que envolve entidades como DFID (*Department for International Development*), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis) / ITTO (*International Tropical Timber Organization*), EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, indústrias madeireiras e universidades, todas interessadas numa estratégia que permita a exploração da floresta sem o comprometimento da sobrevivência e continuidade das espécies.

Os estudos do Projeto Dendrogene vêm sendo realizados numa área monitorada de 500 hectares de floresta primária na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA Tapajós) em Belterra PA, na altura do km 83 da BR 163, Rodovia Santarém-Cuiabá. Esses 500 hectares fazem parte de uma PEI (Parcela de Estudos Intensivos) destinada a estudos ecológicos e genéticos antes e após a exploração madeireira. A FLONA Tapajós consiste numa área de cerca de 600.000 hectares com temperatura média anual de 25°C e umidade relativa de 86% (76-93%). Média de chuva anual de 2110 mm com chuvas intensas entre março e maio e pouca chuva entre agosto e novembro (Carvalho, 1982) *apud* Carvalho (2004). Este projeto visa a conservação e definição de estratégias de manejo de árvores madeireiras em florestas manejadas da Amazônia (Kanashiro *et al.*, 2001) por meio de estudos ecológicos, botânicos e genéticos de espécies-modelo que são intensamente exploradas pela indústria madeireira,

escolhidas de acordo com diferenças em suas características reprodutivas, adaptativas e de crescimento, de forma a representar a maior quantidade de grupos de sucessão (pioneiras ou clímax), sistemas reprodutivos (hermafroditas, monóicas e dióicas), com diferentes tipos de polinizadores, tempo e época de floração, ciclo reprodutivo e taxa de crescimento. Um das espécies escolhidas para os estudos é a *Manilkara huberi* (Ducke) A.Chev. da família Sapotaceae, cujos estudos genéticos estão descritos neste trabalho.

A estratégia do projeto é utilizar um modelo de simulação (Eco-Gene versão Tropical) que considere fatores ecológicos, fenológicos, demográficos e genéticos, visando, por meio de simulações, estimar o impacto de diferentes cenários de exploração na diversidade e estrutura genética das espécies, com o intuito de sugerir um sistema de manejo que seja realmente sustentável para cada espécie.

A espécie *Manilkara huberi*

M. huberi é popularmente conhecida como maçaranduba ou maçaranduba verdadeira (Figura 01A). Esta é uma árvore que atinge até 50 m de altura, possui tronco ereto e cilíndrico com ritidoma marrom-acinzentado a escuro ou avermelhado, com fissuras profundas. Ocorre na Amazônia principalmente em regiões de terra firme. Pode ser encontrada no Caribe, América Central e Sul e no velho mundo. Esta é uma das espécies arbóreas amazônicas mais conhecidas e de maior ocorrência (10,5 indivíduos de zero a 140 cm de DAP/ha) mesmo entre espécies do mesmo gênero. Apesar de ser facilmente identificada pelas suas folhas grandes e amareladas na face abaxial (Figura 01C), é frequentemente confundida com outras espécies do gênero devido a similaridades dos seus troncos (Dendrogene, 2004).

No grupo sucessional pode ser considerada espécie clímax, é hermafrodita e algumas populações florescem em intervalos de cinco anos, enquanto outras florescem anualmente.

As flores passam primeiro por uma fase feminina, com sépalas e pétalas ainda fechadas e somente o ponto do estigma fica exposto na abertura das pétalas. Os estames liberam pólen na fase masculina (Figura 01D). Estas flores são polinizadas por moscas e abelhas que apresentam vôo de médio alcance (Figura 01B). A floração e a conseqüente frutificação são influenciadas por uma série de fatores bióticos e abióticos e na Amazônia a frutificação irregular pode ser influenciada pela baixa fertilidade do solo (Ferraz *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004).

M. huberi é a verdadeira maçaranduba e a espécie mais valiosa do gênero devido sua madeira, que é muito dura e resistente, cuja densidade varia entre 0,9 e 1,04 g/cm³ (Ferraz *et al.*, 2004), sendo a espécie com madeira mais densa da família Sapotaceae. Essas características estão associadas ao seu crescimento muito lento, sendo a que atinge maior DAP (diâmetro a altura do peito) do gênero e conseqüentemente é a mais explorada. Além do uso da madeira, na construção externa, dormentes e pisos industriais, seu látex é comestível e consumido como substituto do leite de vaca. Comercialmente seu látex é muito inferior ao das outras espécies. A polpa dos frutos serve de alimento para vários animais, entre eles os macacos que são os principais dispersores, sendo comestível também para humanos, e às vezes comercializado em feiras regionais.

Os madeireiros geralmente agrupam sob o mesmo nome comercial “maçaranduba” várias espécies (*M. huberi*, *M. paraensis*, *M. cavalcantei*, *M. bidentata spp. surinamensis*) e as cortam da mesma forma. No entanto, cada espécie tem sua dinâmica de população (DAP máximo, relação crescimento/taxa de mortalidade, sistema de reprodução) o que tem papel crucial na reconstituição futura dos estoques exploráveis. Caso não haja distinção clara entre as espécies nos inventários comerciais, em cerca de 30 anos não restarão estoques de árvores grandes de *M. huberi* e as remanescentes serão em grande parte das outras espécies do

gênero. Estudos realizados em Paragominas, Pará, mostram que isso já está acontecendo (Dendrogene, 2004).

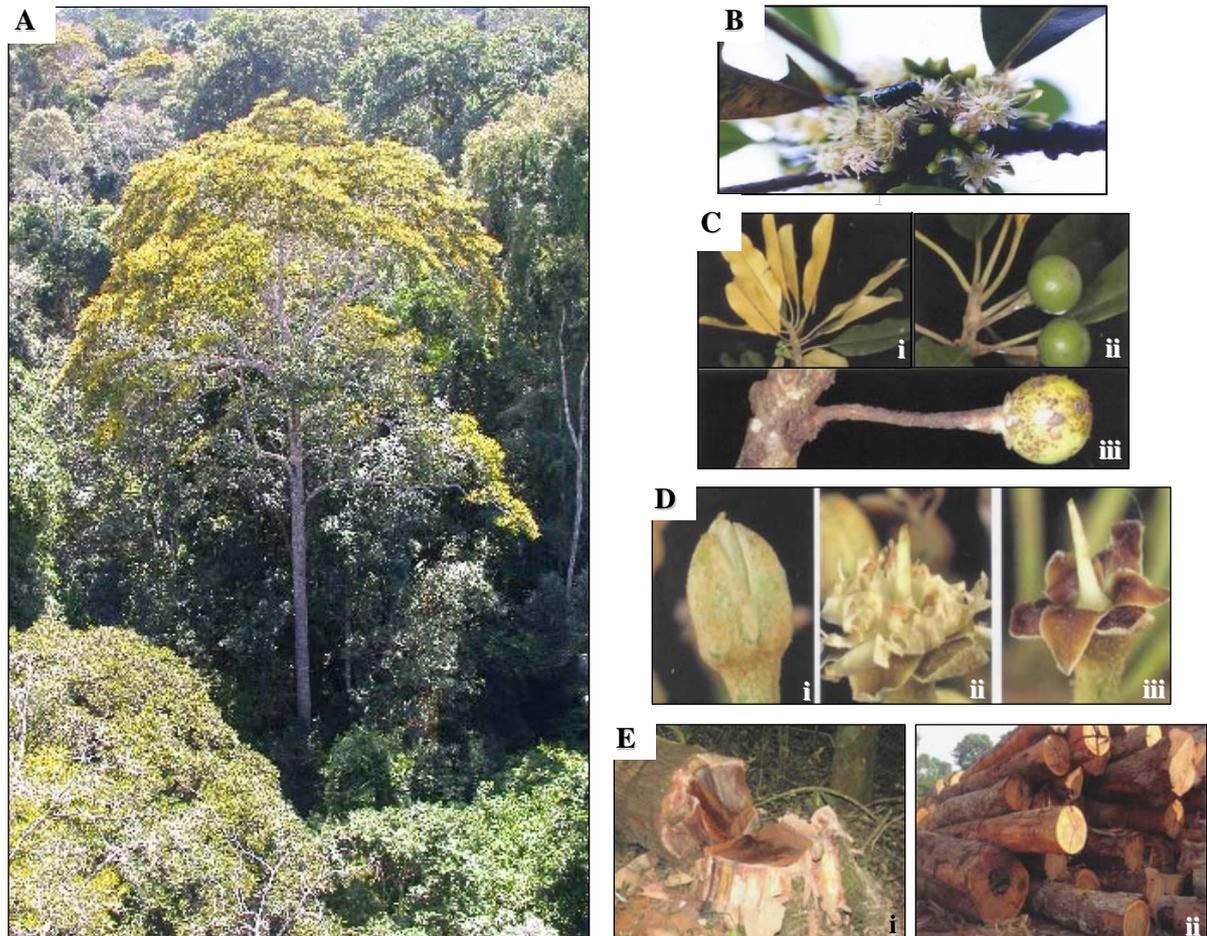


Figura 01. A) Árvore de *Manilkara huberi* na FLONA Tapajós. Copa amarelada devido à cor da face abaxial de suas folhas. B) Polinizador. C) Frutos. (i) frutos jovens e detalhe da folha amarelada na face abaxial; (ii) frutos verdes; (iii) fruto maduro. D) Fases de abertura da flor: (i) fase feminina; (ii) fase masculina; (iii) pós-fertilização. E) Troncos de *M. huberi*. (i) base de uma árvore recém cortada; (ii) toras após o corte. A e B – Fotos de Márcia Maués. C, D e E - Fotos da coleção espécies arbóreas da Amazônia, Projeto Dendrogene.

Marcadores moleculares

A avaliação da diversidade genética sempre foi de interesse primário para os geneticistas de populações. A variação genética pode estar estruturada no tempo e no espaço. O desenvolvimento e a manutenção dessa estrutura devem-se a fatores como o conjunto

gênico, a organização da variabilidade nos genótipos e a distribuição espacial destes genótipos, o sistema reprodutivo, o sistema de polinização e dispersão de sementes, eventos estocásticos como deriva genética e processos ecológicos como recrutamento, crescimento populacional, mortalidade e fecundidade (Wright, 1931; 1943). Estimar a diversidade genética, o fluxo gênico, o sistema de cruzamento e a estrutura genética espacial de espécies ameaçadas e exploradas é um passo importante no sentido da conservação e manejo sustentado.

O surgimento das técnicas que envolvem o uso de marcadores moleculares propiciou um grande avanço nos estudos de genética, em programas de melhoramento genético de animais e plantas e em estudos de diversidade genética de populações, em especial aqueles com vistas à conservação. Vale ressaltar que os marcadores moleculares de modo geral se baseiam em polimorfismos de regiões não expressas do genoma, e por isso não dizem respeito à diversidade de genes. A diversidade estimada é na verdade uma diversidade genética molecular e diz respeito à deriva genética e é efeito da amostragem. Neste trabalho, referências à diversidade genética molecular serão feitas apenas como diversidade genética.

Diversas técnicas estão hoje disponíveis para detecção da diversidade genética ao nível de seqüências de DNA, ou seja, do polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um grande número de marcadores moleculares com herança mendeliana dominante ou codominante e com ampla cobertura genômica.

O RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi o primeiro marcador molecular a ser desenvolvido. O polimorfismo é evidenciado pela digestão do DNA com enzimas de restrição e é observado por hibridização destes fragmentos com sondas radioativas de seqüências homólogas de DNA.

Seqüências repetitivas são importantes ferramentas para análises genéticas, uma vez que oferecem a possibilidade de amostrar simultaneamente um grande número de locos

genéticos polimórficos dispersos no genoma. Na classe desses marcadores os VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) representam os baseados em seqüências hiper-variáveis de minissatélites que possuem de 15 a 100 pares de bases repetitivas até 100 vezes em cada loco hiper-variável. O princípio de obtenção deste marcador é essencialmente o mesmo do utilizado para RFLP.

O advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (Mullis & Faloona, 1987) acelerou o desenvolvimento de novas classes de marcadores. A primeira delas foi denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) que, desenvolvida por Williams *et al.* (1990), é baseada na amplificação de segmentos ao acaso estando fundamentada na utilização de iniciadores curtos (10 pares de base), apenas um iniciador por reação e de seqüência arbitrária. Outras denominações da mesma técnica são AP-PCR (*Arbitrarily Primed – PCR*; Welsh & McClelland, 1990) e DAF (*DNA Amplification Fingerprint*; Caetano-Anóles *et al.*, 1991.). Apesar de suas limitações, esta foi intensamente utilizada com sucesso em trabalhos envolvendo mapeamento e estabilidade de QTLs (Grattapaglia & Sederoff, 1996), seleção assistida por marcadores e uma série de trabalhos sobre variabilidade genética como os realizados por Buso *et al.* (1998) com *Oryza glumaepatula*, Ciampi & Magalhães (2001) com espécies arbóreas e Ciampi *et al.* (2003) sobre variabilidade genética de *Tabebuia impetiginosa*.

Os marcadores moleculares AFLPs exploram o polimorfismo decorrente da variação na posição de sítios de enzimas de restrição nos diferentes indivíduos associado à variabilidade na seqüência de nucleotídeos que flanqueiam essas seqüências. Esses marcadores não apresentam as mesmas vantagens dos RAPDs em relação à acessibilidade e custo, no entanto um número muito superior de locos polimórficos podem ser detectados por reação.

Historicamente o termo microssatélite era utilizado apenas para descrever seqüências repetitivas dinucleotídicas, sendo hoje utilizado como referência à seqüências repetitivas de até seis bases. Uma variedade de nomes tem sido utilizada para descrever seqüências repetidas *in tandem*, incluindo SSR (*Simple Sequence Repeats*; Tautz, 1989) e STR (*Short Tandem Repeats*; Edwards *et al.*, 1991).

Estudos realizados nas últimas décadas têm demonstrado que o genoma de eucariotos é densamente povoado por diferentes classes de seqüências repetitivas como os microssatélites, ou SSR (Hamada *et al.*, 1982). Poucos marcadores genéticos possuem um uso tão difundido como estes que são um dos tipos mais variáveis de seqüências de DNA no genoma, característica essa que associada à ocorrência com ampla distribuição no genoma (Tóth *et al.*, 2000) explicam a grande utilidade deste marcador (Ellegren, 2004).

Locos microssatélites têm sido descritos para uma série de espécies incluindo variedades de culturas agrícolas como arroz, cevada, feijão, milho, algodão, soja. Nos últimos anos a identificação de locos SSR se estendeu para espécies florestais como eucalipto, araucária, copaíba, andiroba, cedro, jatobá, pequi, palmito e mogno. Todos estes trabalhos demonstraram que esse marcador é altamente multi-alélico e informativo para estudos de estrutura genética de populações, permitindo estimar com precisão relações de parentesco e fluxo gênico. Esse marcador pode ser usado tanto para identificação individual quanto para associação com características de interesse (Weir, 1996). Os SSRs representam uma ferramenta importante para a execução de análises genéticas que visam obter critérios e indicadores práticos da sustentabilidade genética do manejo florestal e têm sido utilizados com muita freqüência em estudos com vistas a fornecer subsídios aos programas de conservação.

A distribuição, a freqüência e as classes de microssatélites variam entre as classes de organismos. Seqüências poliA são mais freqüentes no genoma humano porém, apesar da

abundância não são ideais para mapeamento ou análises populacionais por serem altamente instáveis em condições de PCR. Beckmann & Weber (1992) demonstraram que dinucleotídeos abundantes em humanos são CA/GT e ocorrem duas vezes mais que as repetições AG/TC. Em plantas, os dinucleotídeos mais comuns são AT/TA, seguidos por AG/TC sendo o menos comum CA/GT (Lagercrantz *et al*, 1993). No entanto, os dinucleotídeos AT/TA são também instáveis em condições de PCR por formarem estrutura *hairpin*. Devido a isso, os dinucleotídeos mais comuns em estudos genéticos de plantas são os poliAG/TC. Por outro lado, microsatélites de repetições CA/GT são os mais comuns em *Drosophila melanogaster* (Schug *et al*, 1998). A diferença entre espécies poderia ser puramente devido ao acaso, ou poderia refletir mecanismos que ocorrem em seqüências particulares, ou até mesmo seleção que age em seqüências que adotaram funções particulares dentro de uma determinada linhagem evolutiva (Goldstein & Schlotterer, 2001).

Microsatélites têm sido detectados em genomas de todos os organismos até hoje estudados, incluindo procariotos e eucariotos (Zane *et al.*, 2002), sendo encontrados numa freqüência superior do predito com base unicamente na composição de bases nitrogenadas, ou seja, o acaso. Os SSRs apresentam alta taxa de polimorfismo, isto é, são multi-alélicos ou hiper-variáveis, possuem herança codominante e são seqüências formadas por um motivo de uma única seqüência de até seis bases repetidas *in tandem* sem interrupção por outra base ou motivo (Goldstein & Schlotterer, 2001) e são classificados em perfeitos (repetições de um motivo sem interrupção), imperfeitos (possuem um ou mais nucleotídeos interferindo na ordem das repetições) ou compostos (dois conjuntos de repetições unidos) (Weber & May, 1989).

Microsatélites de dinucleotídeos são os mais freqüentes e os mais polimórficos, seguidos pelos de tri e tetranucleotídeos. Em virtude da alta taxa de polimorfismo, observa-se que a maioria dos trabalhos de desenvolvimento de marcadores microsatélites é realizada

para seqüências de dinucleotídeos. Entretanto, a genotipagem de indivíduos utilizando marcadores deste tipo é mais delicada e portanto, é preferível que seja realizada em equipamentos de alta resolução e precisão, como os analisadores automáticos de fragmentos que utilizam fluorescência, sendo capazes de realizar uma discriminação precisa ao nível de uma unidade de base nitrogenada.

Vários modelos da dinâmica evolucionária dos microssatélites foram propostos, sendo que a maioria deriva do modelo de mutação definido como *stepwise* (Ellegren, 2004; Goldstein & Schlotterer, 2001), que ocorre por *slippage* ou “escorregamento”. O modelo postula que uma mutação altera o comprimento de uma região repetitiva por meio da adição ou remoção de uma unidade repetitiva. Isso deve ocorrer devido à dissociação transiente da fita de DNA que está sendo sintetizada seguida por um reanelamento não pareado corretamente (Levinson & Gutman, 1987). No entanto a maioria dessas mutações é corrigida pelo sistema de reparo e apenas uma pequena fração que não foi reparada termina como um evento de mutação em SSR. Replicações com escorregamento também ocorrem em reações de PCR e podem ser um dos motivos da presença de bandas *stutters* (Ellegren, 2004). Outro tipo de mutação que deve ocorrer em SSR envolve recombinação entre moléculas de DNA (Smith, 1976). Estimativas mostram que a taxa de mutação em SSR *in vivo* ocorre em torno de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por replicação dependendo do organismo (Goldstein & Schlotterer, 2001).

Microssatélites, assim como minissatélites são geralmente considerados como seqüências que possuem função como marcadores para estudos em genética de populações, relações evolucionárias e mapeamento. Entretanto, muitas evidências que têm sido acumuladas mostram que seqüências microssatélites apresentam papel funcional como elementos codificadores e regulatórios agindo como reguladores *upstream* à promotores de seqüências codificadoras e muitas vezes são conservados em relação à essas seqüências

(Kashi *et al.*, 1997; Künzler *et al.*, 1995). Também foi demonstrado que microssatélites se ligam às proteínas estando associados à efeitos funcionais (Goldstein & Schlotterer, 2001). Finalmente, estudos recentes mostraram efeitos fenotípicos de variação de comprimento de seqüências microssatélites na fisiologia e desenvolvimento de organismos. Se vistos como elementos funcionais do genoma, uma característica especial dos microssatélites como *hotspots* de mutação levam a pensar que talvez sejam a maior fonte de variação genética quantitativa e adaptação evolucionária (Goldstein & Schlotterer, 2001; Kashi *et al.*, 1990,1997; King, 1994).

Apesar de todas as vantagens descritas em se utilizar seqüências SSR, como multialelismo, altas taxas de polimorfismo, e alta informação por loco gênico, cuidado deve ser tomado ao se utilizar esses locos em estudos de genética de populações envolvendo evolução e conservação. De acordo com Hedrick (1999) a interpretação da significância dos resultados obtidos em estudos com estes marcadores deve ser feita com cautela, pois as estimativas de distância e diferenciação genética são influenciadas pelo nível de heterozigosidade, que no caso dos SSRs não correspondem à verdade biológica uma vez que são regiões hiper-variáveis.

Desenvolvimento de SSRs e conservação dos locos

Uma grande limitação da utilização dos SSRs está no alto custo, tempo e mão de obra especializada necessários para o desenvolvimento de iniciadores específicos que flanqueiam as regiões de DNA repetitivo em cada espécie. Entretanto, a grande popularidade dos SSRs pode ser demonstrada pelo crescimento no número de publicações descrevendo o isolamento destes marcadores em vários organismos. No Brasil uma série de laboratórios vem desenvolvendo marcadores SSR para diversas espécies e alta eficiência tem sido observada na transferibilidade destes marcadores entre espécies de mesmo gênero e até mesma família

devido à alta conservação das regiões que flanqueiam os SSRs apesar das altas taxas de mutações nas seqüências microssatélites.

Existem várias formas de buscar seqüências SSR, desde buscas em bancos de seqüências, transferibilidade entre espécies correlatas e desenvolvimento a partir de uma série de diferentes protocolos como os descritos por Zane *et al.* (2002).

O chamado método tradicional se baseia no isolamento de pequenos fragmentos de DNA e seleção por hibridização com sondas contendo seqüências repetitivas. Apesar de eficiente para algumas espécies esse método se torna bastante trabalhoso e ineficiente para espécies que possuem baixas freqüências de SSR, tornando necessário seqüenciar centenas de clones em troca de poucos com seqüências microssatélites. Nesse sentido, outras estratégias foram desenvolvidas com o objetivo de otimizar o processo. Alguns autores propuseram modificações no protocolo de RAPD, seja usando iniciadores ancorados com seqüências repetitivas seja usando iniciadores RAPD e em seguida hibridização do produto de PCR com sondas microssatélites. Outra estratégia baseada em PCR consiste na utilização de iniciadores ancorados com seqüências repetitivas, para em seguida seqüenciar. Embora seja um método relativamente fácil, não tem sido utilizado com freqüência (Zane *et al.*, 2002).

Os métodos mais utilizados são sem dúvida aqueles que envolvem construções de bibliotecas genômicas. Dois destes métodos são os descritos por Ostrander *et al.* (1992) e por Paetkau (1999), sendo que o último é semelhante ao descrito por Rafalsky *et al.* (1996). Esses métodos têm como objetivo construir bibliotecas genômicas enriquecidas para seqüências SSR e se diferenciam no fato em que no protocolo de Paetkau (1999) alguns passos adicionais estão presentes, os quais utilizam contas magnéticas ligadas à oligonucleotídeos de seqüência repetitiva para a recuperação dos fragmentos contendo SSR. O isolamento de seqüências SSR por hibridização seletiva também é uma técnica muito eficaz e comumente utilizada em

associação com a construção de biblioteca genômica enriquecida, que apesar de ser um procedimento trabalhoso, confere resultados satisfatórios.

Esse método de construção de biblioteca genômica enriquecida utilizando contas magnéticas ligadas à Bio-oligos associado à hibridização seletiva de clones foi o aplicado neste trabalho.

Sistemas semi-automatizados de genotipagem utilizando SSRs.

O uso de marcadores microssatélites em estudos populacionais onde centenas de indivíduos são genotipados evoluiu para o desenvolvimento de sistemas de análise semi-automatizada, buscando a formação de sistemas *multiplex* e metodologias que possam economizar a marcação fluorescente, cujo custo é elevado, sem perder a qualidade e precisão da genotipagem. Este método de detecção semi-automática com marcação fluorescente apresenta uma série de vantagens sobre as metodologias convencionais, como as análises em géis de poliacrilamida com resolução em nitrato de prata, incluindo rapidez e precisão na geração de dados, análise simultânea de vários locos, minimização da manipulação manual e alto potencial de transferência entre laboratórios.

Este sistema se baseia na amplificação de fragmentos de DNA via PCR de um ou mais locos microssatélites utilizando um dos iniciadores marcado com fluorocromo. Os fragmentos são separados após aplicação de uma corrente elétrica num gel de poliacrilamida em analisador automático de fragmento ABI 377, e.g., e detectados a laser.

A técnica que utiliza iniciadores *tailed* é prática, permite satisfatória economia de fluorescência e utiliza três iniciadores numa mesma reação de PCR. Em um dos iniciadores é adicionada uma “cauda” e o segundo iniciador se mantém. Um terceiro iniciador, chamado repórter ou marcado está conjugado com a fluorescência e anela no complemento da seqüência da cauda a partir do terceiro passo da reação de PCR. Essa mesma cauda pode ser

sintetizada junto com iniciadores de diferentes locos e o iniciador marcado usado em todos os casos, evitando sobra de iniciadores marcados ao final do estudo da espécie alvo. É importante que a seqüência da “cauda” seja incomum à seqüência do organismo que será genotipado. Nesse sentido, Oetting *et al.* (1995) e Schuelke (2000) utilizam a seqüência do iniciador M13 de plasmídeo bacteriano como cauda para todas as fluorescências. Essa metodologia foi otimizada por Missiaggia & Grattapaglia (2006) que utilizam seqüências de três locos do cromossomo Y humano, para genotipagem de plantas, permitindo uma seqüência específica para cada fluorocromo e a utilização de todos numa mesma reação de PCR *multiplex*.

A estrutura genética de populações de plantas

A estrutura genética refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, resultantes da ação de forças evolutivas tais como mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e da população (Hamrick, 1982).

A diversidade genética de um loco marcador corresponde à probabilidade de ocorrência de polimorfismo entre indivíduos tomados ao acaso (Rafalsky *et al.*, 1996). Para estimar essa diversidade, uma variedade de índices que representam o conteúdo informativo de um loco pode ser utilizada para diferentes aplicações como na identificação individual e na análise de parentesco, na estimativa do fluxo gênico, na definição do sistema de cruzamento e na determinação da estrutura genética espacial.

A estimativa da freqüência de um alelo particular em uma população, chamada freqüência alélica, é considerada fundamental nos estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pelas mudanças nas suas freqüências gênicas (Nei, 1978). O número de alelos observados por loco aumenta em função do tamanho da

amostragem. Conseqüentemente grandes amostras possuem maior chance de que alelos raros sejam detectados.

De acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, em uma população de tamanho infinito, praticando cruzamentos ao acaso, as freqüências gênicas e genotípicas permanecem constantes de geração para geração na ausência de migração, seleção e mutação. Este princípio permite o cálculo teórico da freqüência de um determinado genótipo independente do número de alelos existentes.

O número de alelos por loco, a heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) têm sido os parâmetros genéticos mais utilizados em vários estudos para estimar a diversidade genética em populações de plantas. O parâmetro H_e diz respeito à probabilidade de dois gametas, tomados ao acaso de uma população terem alelos diferentes em um determinado loco, sendo definida como a diversidade genética de Nei (1973) esperada segundo o princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). O parâmetro H_o representa a real taxa de indivíduos heterozigotos na população estudada. Assim tem-se que:

$$\hat{H}_e = 1 - \sum (p_i^2) \quad \text{e} \quad \hat{H}_o = 1 - \sum P_{ii}$$

Em que p_i = freqüência alélica estimada do i -ésimo alelo; P_{ii} = freqüência estimada do homozigoto ii . A estimativa média desses valores é calculada pela média aritmética entre todos os locos analisados. A relação entre essas estatísticas define o índice de fixação de Wright (f) cuja média é o desvio da proporção dos indivíduos heterozigotos observados do esperado segundo o EHW. O índice f é o valor individualizado do F_{IS} das estatísticas- F de Wright (Wright, 1965) que é o valor médio do índice de fixação de alelos dentro de populações, e caracteriza o nível médio de endogamia ao nível populacional.

$$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_0}{\hat{H}_e} \text{ (ao nível de loco)} \quad \hat{f} = 1 - \frac{\sum \hat{H}_0}{\sum \hat{H}_e} \text{ (média entre locos)}$$

As estatísticas- F permitem ainda a caracterização da distribuição da diversidade genética entre as populações (F_{ST}), assim como dos níveis de endogamia para o total de populações (F_{IT}). De acordo com Wright (1965) as estimativas F se relacionam, pois:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

O *bootstrapping* é um método que opera desenhando aleatoriamente uma reamostragem de genótipos e estima a probabilidade de o valor encontrado poder ter sido ao acaso. Caso o intervalo dos valores dado pelo *bootstrap* (*upper* e *lower*) inclua o zero, o resultado obtido não é consistente.

A perda da diversidade genética é o tópico central da conservação genética. Áreas fragmentadas onde existem pequenas populações estão propensas à endogamia e deriva genética resultantes da subdivisão. A endogamia pode atuar desmascarando determinados alelos deletérios recessivos, principalmente de plantas alógamas levando a diminuição do valor adaptativo da população a curto prazo, causando redução da heterozigosidade, podendo resultar em perda de diversidade alélica. Biólogos e conservacionistas acrescentam que este declínio na variação genética pode inibir no futuro a adaptação do organismo às mudanças ambientais e conseqüentemente limitar seu potencial evolucionário, podendo levar essas populações a um possível risco de extinção (Zucchi, 2002).

O fluxo gênico pode ser definido como o movimento de genes em populações e, portanto, inclui todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente

trocam genes na distribuição espacial (Neigel, 1997). Segundo Slatkin (1981; 1985) fluxo gênico (ou fluxo alélico) é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra.

De acordo com Futuyma (1993) o grau no qual uma população pode ser delimitada depende do nível de fluxo gênico, o qual influencia o tamanho efetivo da população. Entre os modelos de fluxo gênico, que correspondem a diferenças na estrutura da população, estão:

1. O modelo de “continente-ilha”: efetivamente existe um movimento unidirecional de uma população grande, “continental”, para uma menor e isolada (Figura 02A);

2. O modelo de “ilhas”: a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações (Figura 02B);

3. O modelo “stepping-stone” (ou “alpondras”): cada população recebe migrantes somente das populações vizinhas (Figura 02C);

4. O modelo de “isolamento por distância”: o fluxo gênico ocorre localmente entre os vizinhos, em uma população de distribuição contínua (Figura 02D).

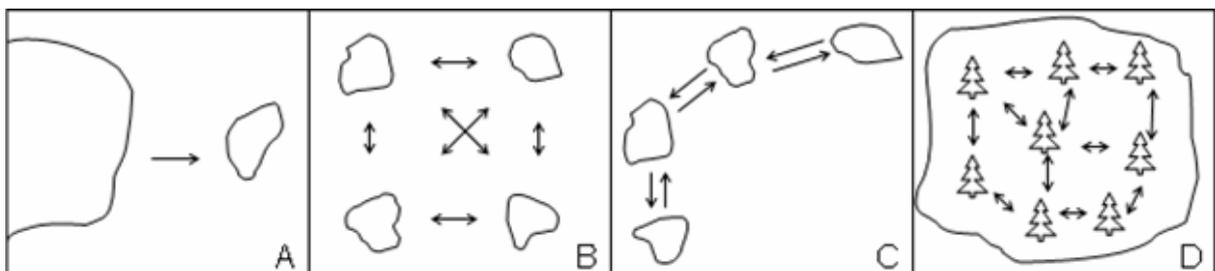


Figura 02. Modelos de fluxo gênico. **A)** Modelo continente-ilha; **B)** Modelo de ilhas; **C)** modelo de alpondras e **D)** Modelo de isolamento por distância.

Esse processo de “isolamento por distância” ocorre quando há restrições ao fluxo gênico que podem levar as populações a diferenciar-se geneticamente, ocasionando uma estruturação espacial da diversidade genética e apresenta um padrão de mudanças genéticas semelhantes à endogamia, na medida em que leva a um excesso de homozigotos.

O modelo de ilhas proposto por Sewall Wright é o modelo convencional de genética de populações de troca de genes entre populações. Neste modelo o número efetivo de migrantes, Nm , é estimado através das estatísticas- F para um conjunto n de populações. O modelo assume equilíbrio entre migração e deriva genética entre todas as populações, e assume que todas as populações são iguais fontes de migrantes e produz estimativas que não refletem a variação contemporânea na troca de genes entre populações ou mudanças atuais no processo dispersivo.

O fluxo gênico pode ser estimado por medidas diretas e indiretas. As medidas diretas referem-se ao fluxo gênico contemporâneo, enquanto que as indiretas são baseadas na estrutura de populações e referem-se ao fluxo gênico histórico ou passado. Os métodos diretos são inferidos por meio da utilização de corantes, marcadores morfológicos e análises de paternidade. Ainda hoje há relativamente poucas medidas diretas do fluxo gênico em populações de plantas (Zucchi, 2002). Uma complicação que acontece com plantas é que os genes podem se mover em dois caminhos, sementes e pólen, e para uma acurada medida do fluxo gênico ambos devem ser quantificados. Entretanto, apesar de importante na definição do fluxo gênico, a dispersão de sementes não fornece informações sobre o sistema reprodutivo.

O teste de paternidade é uma excelente ferramenta para a definição do fluxo de pólen e conseqüentemente o fluxo gênico nas populações. Esse método consiste na utilização de locos gênicos como o objetivo de identificar o pai mais provável dentre um conjunto de candidatos. Uma vez que o provável pai é identificado, o padrão de movimento do pólen na população pode ser determinado. Uma estimativa bastante utilizada é a de exclusão de paternidade onde qualquer provável pai cujo genótipo for incompatível com o genótipo da semente é rejeitado como pai, até que reste apenas um único provável pai possível. Os problemas relativos a este método são que mais de um provável pai pode não ser excluído ou o verdadeiro pai pode ser excluído por erro de genotipagem ou mutação. Uma forma de contornar o problema é utilizar

o método baseado em máxima verossimilhança como o desenvolvido por Marshall *et al.* (1998) que tolera erro de genotipagem e define o indivíduo com mais chance de ser o pai com base nas frequências alélicas, mesmo que vários indivíduos não tenham sido excluídos. A resolução desse procedimento de teste de paternidade é dependente do número de locos polimórficos, número de alelos por loco, frequência alélica e número de potenciais pais (Marshall *et al.* 1998).

As taxas de cruzamento de uma população podem ser definidas em dois níveis: a multiloco (t_m) e a uniloco (t_s). A diferença entre essas taxas ($t_m - t_s$) define a taxa de cruzamento entre aparentados. A taxa de autofecundação (s) é igual a $1 - \hat{t}_m$. O modelo de Ritland & Jain (1981) permite fazer estas estimativas e assume que as plântulas resultam de uma mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundação, cujas pressuposições básicas são: a) o conjunto de pólen é homogêneo para os cruzamentos com todos os genótipos maternos; b) os alelos de diferentes locos segregam independentemente; c) os locos não são afetados pela seleção ou mutação entre o evento reprodutivo e a análise.

A estimação da estrutura genética espacial de árvores tem se tornado importante nos últimos anos, e um grande número de estudos experimentais de estrutura genética espacial de populações de plantas têm sido publicados. Diferentes estatísticas podem ser utilizadas para descrever e quantificar a estrutura genética espacial. O índice I de Moran está entre as medidas mais utilizadas. Mais recentemente, medidas multiloco de autocorrelação espacial baseada em distância genética foram introduzidas. Degen (2003) utiliza esses índices para a construção de distogramas de correlação. Na verdade, os dois métodos, o que utiliza correlação e o que utiliza distância, geram dois distogramas inversos no sentido em que um mostra correlação e o outro distância genética ao nível de indivíduo ao longo de diferentes classes de distância espacial. Essas medidas também podem ser realizadas utilizando-se o coeficiente de coancestria, como o proposto por Loiselle *et al.* (1995) que calcula a

probabilidade de dois alelos serem iguais por descendência entre pares de indivíduos, e define o grau de parentesco entre indivíduos por classes de distâncias, definindo se há estruturação genética espacial e em que grau isso ocorre.

Marcador molecular citoplasmático - cpDNA

O genoma de cloroplasto (cpDNA) das plantas terrestres é um cromossomo circular que varia de 60 a 217 Kb. Sua estrutura é caracterizada pela presença de uma região de repetição invertida. Mudanças na complexidade e estrutura do genoma ocorrem geralmente por mutações de comprimento, pela adição de novas seqüências ou deleção de seqüências existentes. A grande maioria das mutações é pequena, envolvendo de 1 a 10 pares de base localizados na região não codificadora e as substituições de nucleotídeos são raras (Zurawsky *et al.*, 1984).

Embora existam casos de herança biparental, na maioria dos casos o cloroplasto apresenta herança uniparental, sendo herdado da mãe no caso das angiospermas. A ausência de recombinação na molécula durante a meiose faz com que ela seja herdada clonalmente e não ser devido a mutações (Palmer, 1987). Conseqüentemente o cpDNA contém muita informação histórica e consiste num excelente marcador para estudos sobre evolução.

A taxa de evolução no cpDNA é muito lenta, em média cinco vezes mais lenta do que do DNA nuclear. Esta molécula varia pouco no comprimento e o acúmulo de substituições de bases é extremamente lento (Palmer, 1987). Portanto essa molécula apresenta um alto grau de conservação e qualquer alteração gera implicações significativas na filogenia.

Estas características aliadas ao seu tamanho pequeno, fizeram do cpDNA uma molécula muito utilizada em estudos sistemáticos. Estudos recentes comprovam que a variação de cpDNA dentro de uma mesma espécie é grande, tornando-a eficiente nos estudos populacionais (Harris & Ingran, 1991). McCauley (1994) defende a idéia da utilização do

cpDNA em estudos de fluxo gênico. Por se tratar de molécula de herança materna pode ser dispersado por sementes, mas não por pólen. Deste modo informações importantes podem ser obtidas ao associar o estudo desta organela aos estudos de polimorfismo de DNA nuclear.

INTRODUÇÃO GERAL

As atividades de planejamento florestal têm dado tratamento igual às espécies, sem considerar as diferentes peculiaridades biológicas e ambientais. As diferenças entre as espécies exploradas estão relacionadas aos aspectos demográficos, reprodutivos e genéticos. Um sistema de manejo que seja realmente eficiente para cada espécie deve levar em consideração fatores que podem ser alterados com a exploração e comprometer a sobrevivência da espécie.

Nesse sentido, informações sobre a dinâmica das populações devem ser geradas a fim de fornecerem dados que podem ser importantes aos programas de manejo ao nível de espécie. A importância de estudos neste sentido se faz clara diante do avanço acelerado das explorações de áreas florestais, de modo especial na Amazônia, que é a maior extensão de floresta tropical úmida da atualidade e diante da falta de informação sobre a genética de espécies arbóreas nativas.

A condução das atividades em áreas sob manejo na Amazônia brasileira, áreas contínuas de florestas, antes da retirada seletiva de árvores madeireiras, permitirá comparações com estudos em populações alteradas pela exploração, e o impacto dessa exploração na genética das espécies poderá ser quantificado de forma direta.

A espécie *M. huberi* é uma das espécies que se encontram nos programas de manejo, sendo uma das mais exploradas pela indústria madeireira. Apesar disso, ainda hoje não existem estudos sobre as características genéticas desta espécie. Este estudo se faz necessário no sentido de fornecer informações que podem ser úteis para a definição de programas de manejo eficientes para a sobrevivência da espécie.

OBJETIVOS

Este trabalho teve os seguintes objetivos:

- 1) Desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites polimórficos e robustos para utilização em estudos de genética de populações da espécie.
- 2) Analisar a estrutura genética, estrutura genética espacial de uma população natural de *M. huberi*, analisando amostras de indivíduos adultos e plântulas.
- 3) Determinar o sistema preferencial de cruzamento da espécie utilizando famílias de polinização aberta.
- 4) Realizar estudos de paternidade entre indivíduos de diferentes gerações e estimar de forma direta o fluxo gênico via pólen.
- 5) Realizar análise de variabilidade de DNA citoplasmático.
- 5) Com base nos dados genéticos gerados discutir os potenciais efeitos da exploração madeireira, avaliar o possível impacto causado na diversidade genética e gerar subsídios para a conservação e manejo sustentável da espécie baseado em dados reais e simulações que consideram diferentes cenários de exploração.

CAPÍTULO 01

Desenvolvimento e otimização de marcadores moleculares microssatélites para a espécie *Manilkara huberi* (Ducke) A.Chev. e transferibilidade para a espécie *M. multifida*.

Azevedo, V.C.R.; Vinson, C.C.; Ciampi, A.Y. Twelve Microsatellite Loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian Timber Species. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 11-13, 2005.

RESUMO

Os marcadores moleculares têm sido intensamente utilizados como uma ferramenta muito eficiente no estudo de genética de populações. Os microssatélites são um dos marcadores moleculares mais informativos. Estes permitem estudos sobre o impacto da exploração na estrutura genética das espécies e uma definição de estratégias de manejo sendo práticos de serem utilizados, uma vez que podem ser obtidos, seja por construção de bibliotecas enriquecidas, seja por transferibilidade entre espécies de mesmo gênero ou família. Uma das espécies que fazem parte de um programa de manejo sustentável da Floresta Amazônica é a *Manilkara huberi*, uma espécie madeireira intensamente explorada. Para os estudos genéticos desta espécie, treze locos de microssatélites altamente polimórficos foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para repetições AG/TC. Os níveis de polimorfismo foram estimados em gel desnaturante de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata. Um total de 12 árvores adultas provenientes de uma população natural da Floresta Nacional do Tapajós, Belterra, Pará foram utilizadas. Uma média de 6,08 alelos por loco foi detectada, e a heterozigosidade esperada (H_e) variou entre locos de 0,634 a 0,862 com média igual a 0,787. A heterozigosidade observada média (H_o) foi de 0,750 e variou entre 0,417 e 1,00. O poder de exclusão de paternidade na ausência de um genitor ($Pr(Ex_2)$) a priori da bateria de marcadores combinados foi estimado em 0,999998. Dois locos não aderiram ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e para todas as combinações de locos dois a dois não foi rejeitada a hipótese nula de equilíbrio de ligação gamética. Esses locos representam uma ferramenta poderosa para investigações de sistema de cruzamento, fluxo gênico, parentesco e dinâmica populacional em populações naturais de *M. huberi*. Estas são as informações genéticas fundamentais para a implementação de um manejo sustentável eficiente. Na análise de transferibilidade, dentre os 27 locos, nove foram eficientemente transferidos para *M. multifida*, sendo todos estes polimórficos.

Palavras chaves: SSR, *Manilkara*, Sapotaceae, diversidade genética, transferibilidade.

INTRODUÇÃO

A fragmentação de habitats e o corte seletivo de árvores podem reduzir a diversidade genética de espécies através de *genetic bottlenecks* ou “gargalo genético”. A deriva genética, a restrição do fluxo de pólen associados à intensa exploração podem aumentar o isolamento genético e a divergência. Para a definição de programas de manejo eficientes, fatores genéticos como perda de heterozigosidade, variação do índice de fixação e tamanho efetivo populacional devem ser considerados em conjunto com os dados dendrométricos. Para estudos genéticos nesse nível, os marcadores moleculares como os microssatélites têm sido intensamente utilizados, pois são uma ferramenta muito eficiente no estudo de estrutura genética de populações, fluxo gênico, paternidade, viabilidade populacional e na definição dos efeitos da fragmentação, sendo úteis nas definições de estratégias de conservação (Collevatti *et al.*, 1999).

Polimorfismos baseados em seqüências repetitivas de DNA, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites são um dos mais informativos marcadores moleculares. Estes são formados por seqüências de uma a seis bases de comprimento repetidas em "tandem" (Jacob *et al.*, 1991), são co-dominantes, multi-alélicos e encontrados em alta freqüência e com ampla distribuição nos genomas de eucariotos (Tóth *et al.*, 2000). Apresentam o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares (Goldstein & Schlotterer, 2001), e valores de heterozigosidade esperada tipicamente superiores a 0,7 (Collevatti *et al.*, 1999).

Esses marcadores exibem altos níveis de variabilidade devido a diferenças no número de unidades repetitivas. Estudos genéticos sugerem que erro de pareamento causado por escorregamento (*slipped-strand mispairing*) durante a replicação é o mecanismo predominante de mutação em microssatélites (Goldstein & Schlotterer, 2001). SSRs são

encontrados preferencialmente em regiões não codificadoras do genoma, mas podem ser encontrados em regiões codificadoras (Tautz *et al.*, 1989), assim como foi demonstrado que algumas classes de SSR constituem uma importante fonte de variação genética quantitativa, codificando para elementos funcionais de proteínas e agindo como fatores reguladores de transcrição (Kashi *et al.*, 1997).

A distribuição, a frequência e as classes de microssatélites variam entre as classes de organismo, e em plantas, os dinucleotídeos mais comuns são AT/TA (Lagercrantz *et al.*, 1993). No entanto, estes são instáveis em condições de PCR por formarem uma estrutura *hairpin*. Devido a isso, os dinucleotídeos mais comuns em estudos genéticos de plantas são os poliAG/poliTC.

A vantagem em se utilizar marcadores moleculares microssatélites está baseada em duas características: 1. acessibilidade em se desenvolver ou construir bibliotecas genômicas enriquecidas para seqüências SSR; 2. podem ser transferidos para espécies relacionadas, i.e., mesmo gênero e até mesma família. A transferibilidade entre espécies relacionadas é devido à homologia de seqüência genômica e está relacionada ao grau de conservação das seqüências flanqueadoras do SSR e da distância taxonômica das espécies de interesse. Mesmo sendo a transferibilidade uma opção viável, geralmente as condições de reação de PCR devem ser otimizadas.

De acordo com Powell *et al.* (1996) os microssatélites se aproximam de um marcador ideal devido às inúmeras vantagens que apresentam quando comparados a outros marcadores. São abundantes e distribuídos por todo o genoma; são baseados em PCR, o que torna o seu uso bastante prático; possuem alta reprodutibilidade; não requerem radioatividade; são conservados entre espécies; uma vez isolados podem ser facilmente compartilhados entre laboratórios; são automatizáveis em sistemas *multiplex* e apresentam maior conteúdo informativo por loco gênico entre os marcadores moleculares. Parâmetros genéticos úteis

podem ser estimados para uma gama de estudos como identidade genética, construção de mapas genéticos, análises filogenética e evolucionárias.

O desenvolvimento de marcadores microssatélites tem se tornado muito popular devido à facilidade na obtenção e sua praticidade. No Brasil já foram desenvolvidos marcadores microssatélites para várias espécies incluindo *Eucalyptus gaudichaudii* e *E. urophylla* (Brondani *et al.*, 1998), *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al.*, 1999), *Capsicum* spp. (Buso *et al.*, 2000), *Euterpe edulis* (Gaiotto *et al.*, 2000), *Copaifera langsdorffii* (Ciampi *et al.*, 2000), *Phaseolus vulgaris* (Buso *et al.*, 2001; Cerqueira *et al.*, 2004), *Oryza glumaepatula* (Brondani *et al.*, 2001), *Cocos nucifera* (Moretzsohn *et al.*, 2001), *Switenia macrophylla* (Lemes *et al.*, 2002), *Carapa guianensis* (Vinson *et al.*, 2005), *Dipteryx odorata*, *Jaracanda copaia*, *Bagassa guianensis* (Vinson, 2004), *Araucaria angustifolia* (Schmidt *et al.*, 2004) entre outros. A construção da biblioteca genômica pode ser realizada por meio de vários protocolos de enriquecimento, sendo possível aplicar mais de um protocolo na mesma biblioteca, como foi desenvolvido neste trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo construir uma biblioteca genômica enriquecida para seqüências microssatélites para a espécie madeireira amazônica *M. huberi* de modo a gerar ferramenta para estudos de genética de populações, visando fornecer subsídios aos programas de manejo sustentável da espécie que é intensamente explorada pela indústria madeireira.

Objetivos específicos

- ✓ Isolar uma bateria de seqüências de microssatélites de dinucleotídeos AG/TC para a espécie *M. huberi* e desenhar iniciadores para as regiões flanqueadoras dos microssatélites;
- ✓ Otimizar os locos SSR isolados e obter ao menos oito locos polimórficos para os estudos populacionais;
- ✓ Validar os locos estimando preliminarmente a diversidade genética, desequilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e estimativa do poder de exclusão de paternidade;
- ✓ Transferir locos SSR para a espécie *M. multifida*.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo, material vegetal e extração de DNA

A coleta de material foi realizada numa parcela experimental de 500 hectares sob monitoramento na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), Belterra, PA na altura do km 83 da BR 163, Rodovia Santarém-Cuiabá. Essa área foi subdividida em oito blocos. Para a construção da biblioteca genômica, o DNA total foi extraído de folhas de um único indivíduo adulto de *M. huberi* proveniente da área de estudo. Para a otimização dos marcadores desenvolvidos e seleção de locos polimórficos o DNA genômico foi extraído de discos de câmbio de 12 indivíduos amostrados da mesma população de *M. huberi* de forma não aleatória, ou seja, os primeiros indivíduos do inventário do bloco cinco da área de estudo. 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 da trituração utilizando nitrogênio líquido.

Construção da biblioteca genômica enriquecida

Para a construção da biblioteca genômica foi utilizado o protocolo descrito por Rafalski *et al.* (1996) e otimizado para genomas de espécies tropicais na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Buso *et al.*, 2003). A separação dos fragmentos contendo SSR foi feita por hibridização com oligonucleotídeos biotinilados complementares à seqüência repetitiva AG/TC. A recuperação dos fragmentos contendo SSR foi feita por contas magnéticas ligadas à streptavidina. Todo o procedimento foi realizado de acordo com o que segue e está esquematizado na Figura 1.1.

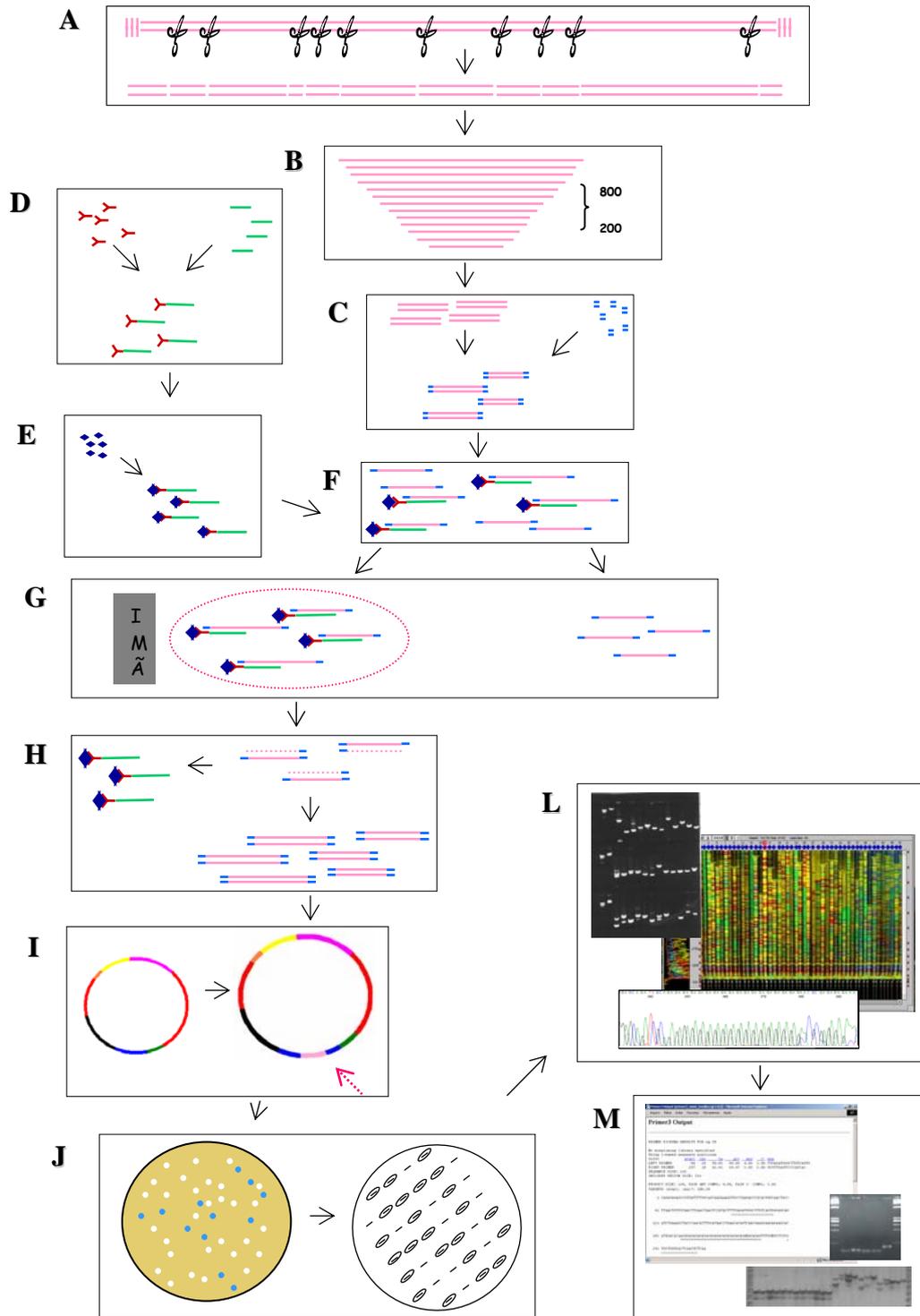


Figura 1.1. Esquema do processo de construção de biblioteca genômica enriquecida para seqüências SSR. **A)** Digestão do DNA com enzima de restrição; **B)** Recuperação dos fragmentos entre 200 e 800 pb; **C)** Ligação de adaptadores aos fragmentos de DNA; **D)** Ligação de biotina aos oligos TC₁₃; **E)** Hibridização de streptavidina à biotina; **F)** Hibridização dos oligos ao DNA; **G)** Recuperação dos fragmentos que contém SSR; **H)** PCR para confirmação do enriquecimento e recuperação da dupla fita de DNA; **I)** Ligação do DNA ao vetor pGEM-T; **J)** Transformação em *E. coli*, replicagem e seleção de clones por hibridização; **L)** PCR e reação de sequenciamento; **M)** Desenho de iniciadores, otimização dos locos e detecção de polimorfismo.

♦ **Seleção da enzima de restrição para digestão do DNA** - O DNA genômico de *M. huberi* foi digerido com três diferentes enzimas de restrição, *Sau3A* (↓GATC), *MseI* (↓TAA) e *Tsp509* (↓AATT) de acordo com o protocolo específico para cada uma delas, com o objetivo de selecionar a que obtivesse a maior quantidade de fragmentos de DNA na região entre 200 e 800 pb (Figura 1.2A). Aproximadamente 50µg de DNA (130 µl de DNA a 400 ng/µl) genômico foram digeridos com 250U de *Tsp509* I (50 µl de enzima a 5 U/µl) em 1x de tampão Ne I (20µl a 10x). A reação foi realizada a 65°C por 12 horas. Toda a reação (200 µl) com 80 µl de tampão de corrida de Ficol 15% foi aplicada em gel de agarose 2%. Como marcador de peso molecular foi utilizado Ladder 1Kb. A eletroforese foi mantida em 100 V por cerca de 2 horas para que houvesse uma boa separação dos fragmentos de DNA (Figura 1.2B). Os fragmentos de 200 a 800 pb foram recuperados do gel por meio de uma purificação com o kit *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante, quantificados em gel de agarose 2% e visualizados em luz UV (Figura 1.2C).

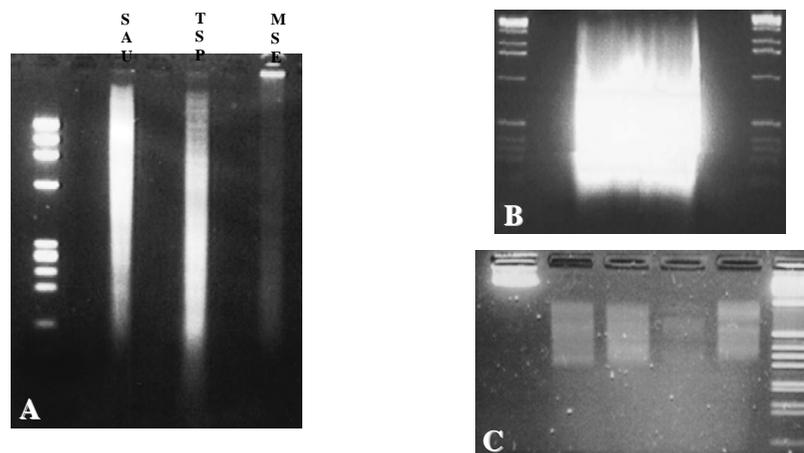


Figura 1.2. A) Seleção da enzima de restrição. O marcador utilizado na primeira linha é o Φ 174. B) Digestão de 50µg de DNA com *Tsp509* I, Ladder 1Kb utilizado como marcador. C) Quantificação da eluição dos fragmentos de 200 a 800pb. Foram utilizados como marcadores de peso molecular λ DNA (200 ng) (primeira pista) e Ladder 1Kb (última pista).

♦ **Ligação do DNA aos adaptadores e ligação de biotina aos oligonucleotídeos** - Cerca de 5µg dos fragmentos de DNA foram ligados a 200 µmol de adaptadores do sítio de restrição de *Tsp509 I*, numa reação com 1x de tampão 10x de T4, 30 U de T4 DNA ligase USB (1 U/µl) e 48 µl de água ultrapura, a qual ficou incubada a 12°C por 12 horas. Os oligonucleotídeos poliAG/TC foram ligados à biotina por meio de uma reação contendo 200 µmol de TC₁₃ (100 µmol/µl), 1x de tampão 10x da terminal transferase, 50 µmol de biotina 16 dUTP, 26,5 U de terminal transferase (15 U/µl) e 26,7 µl de água ultrapura. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos quando se fez a inativação da enzima por adição de EDTA (2M), e a precipitação da reação em 2,5 volumes de etanol absoluto por 12 horas. Em seguida centrifugou-se a 12.000 rpm por 30 minutos, lavou-se o *pellet* em etanol 70% e ressuspendeu-se em 30 µl de água ultrapura.

♦ **Preparo das contas magnéticas para hibridização** - Para a hibridização, 1000 µg de contas magnéticas (*Dynabeads* – Streptavidin Boehringer Mannheim) a 10 µg/µl foram lavadas com 400 µl de tampão PBS + 1% BSA. Em seguida as contas magnéticas foram precipitadas colocando-se o tubo numa estante magnética (Figura 1.3) e o sobrenadante (solução aquosa) retirado com micropipeta. As contas foram lavadas com 400 µl de BEW 1x e a solução aquosa novamente retirada como descrito a cima. Em seguida foram adicionados 200 µl de BEW 2x, 170 µl de água ultrapura e 30 µl de Bio-oligos (biotina + oligos TC₁₃). A solução permaneceu sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente para que houvesse a hibridização da biotina com as contas magnéticas. As contas ligadas aos Bio-oligos foram novamente precipitadas, o sobrenadante retirado e o complexo lavado duas vezes com 400 µl de BEW 1x e uma vez com 400 µl de SSC 5x + SDS 0,1%. Para ressuspender o complexo Bio-oligos-

contas foram adicionados 150 μ l de SSC 10x + SDS 0,2% pré-aquecido a 65°C. A solução foi incubada a 65°C por 15 minutos e armazenada a 4°C.

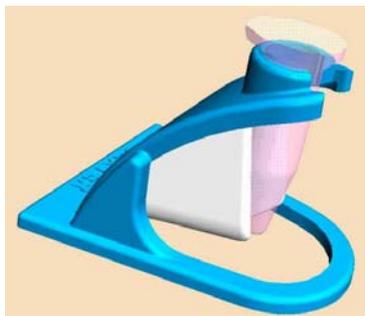


Figura 1.3. Esquema do aparato magnético utilizado para precipitar as contas magnéticas para a retirada do sobrenadante sem prejuízo de perda de DNA. As contas são atraídas pelo ímã da estante e ficam no fundo do tubo.

♦ **Hibridização do DNA + adaptador ao complexo Bio-oligos-contas -**

Preparado o complexo descrito acima, o passo seguinte é a hibridização desse complexo com o DNA + adaptador. Para isso, foi adicionado 0,5 volume de água ultrapura ao complexo DNA + adaptador e este desnaturado a 95°C por 15 minutos. Em seguida sete tubos foram preparados para as lavagens da solução, que têm como objetivo retirar excessos de reagentes como contas, biotina, oligos que não formaram complexos. No primeiro tubo acrescentou-se 1 μ l de DNA + adaptador em 1000 μ l de água ultrapura, o qual foi utilizado como tubo controle. À solução de DNA + adaptador foi adicionado o complexo Bio-oligos-contas e este foi incubado a 65°C por 90 minutos para que ocorresse a hibridização dos fragmentos de DNA que continham seqüências SSR aos oligos TC₁₃. O complexo foi precipitado com auxílio da estante magnética e o sobrenadante retirado e colocado no segundo tubo. Novamente o complexo foi lavado duas vezes, por cinco minutos e duas vezes por 15 min com 400 μ l de SSC 2x + SDS 0,1%. Cada sobrenadante foi retirado e colocado nos tubos de três a seis. Para ressuspender o complexo foram adicionados 200 μ l de água ultrapura.

♦ **PCR para controle do enriquecimento da biblioteca** – a reação de PCR foi realizada com todos os tubos preparados com o objetivo de avaliar o enriquecimento e determinar se houve perda de DNA durante o processo (Figura 1.4). Para isso foram utilizados 2 µl de DNA, tampão PCR 1x (10x, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1 mM dos iniciadores complementares à seqüência dos adaptadores, 0,25 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura estéril para um volume final de 25 µl. O programa de amplificação via PCR foi ajustado no termociclador para: 95°C 3 minutos, 20 ciclos a 94°C 45 segundos, 56°C 45 segundos e 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 7 minutos.

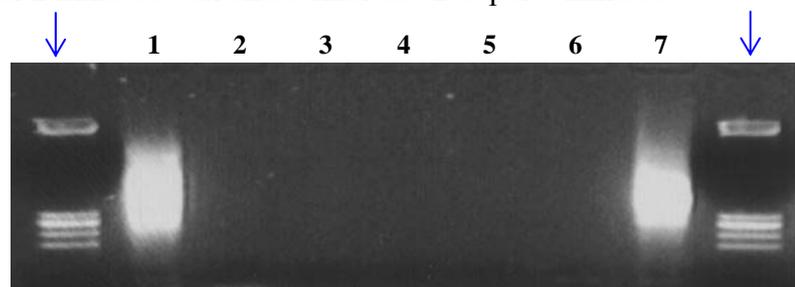


Figura 1.4. Resultado da reação de PCR para controle do enriquecimento. As amplificações ocorreram nas reações cujos *templates* eram o DNA controle (tubo 1) e onde estava o complexo Bio-oligos-contas-DNA (tubo 7). As setas azuis indicam o marcador Ladder Kb.

♦ **Análise de Southern blot com sonda poli AG/TC** – O DNA foi transferido e fixado por meio de luz Ultra Violeta (*crosslinker*) numa membrana *Hybond-N* (Amershan Pharmacia) de acordo com Sambrook *et al.* (1989). A membrana foi então pré-hibridizada (SSC 5x, N-lauroylsarcosine 0,1 %, SDS 0,02 % e *blocking reagent* 1%) por 3 horas a 65°C. A solução de pré-hibridização foi então substituída pela solução de hibridização que continha a sonda poli AG/TC (50 ηg) previamente marcada com digoxigenina e pré-desnaturada a 95°C incubando-se por 12 horas a 65°C. As lavagens da membrana seguiram as recomendações do fabricante (*DIG Luminescent Detection Kit*, Boehringer Mannheim) seguidas de incubação na solução

do anticorpo DIG e na solução de CSPD. A membrana foi envolta em plástico e incubada em estufa a 37°C durante 5 minutos, quando foi exposta ao filme para autoradiografia (Kodak Diagnostic X – Omat K). O DNA das contas magnéticas foi então amplificado via PCR (95°C 3 minutos, 20 ciclos a 94°C 45 segundos, 56°C 45 segundos e 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 7 minutos), quantificado e purificado com *Qiaquick PCR Kit* (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante.

Ligação do DNA ao plasmídeo pGEM-T, transformação e repicagem de colônias

Feito o enriquecimento para fragmentos contendo seqüências hiper-variáveis de SSR, estes foram ligados em plasmídeos pGEM-T Easy (Promega) (Figura 1.5). Para essa reação foram utilizados 400 ng de DNA, 1x de tampão T4 DNA ligase 10x, 3U de T4 DNA ligase, 5 ng de pGEM-T, 3U de T4 DNA ligase e água ultrapura incubando-se a 4°C por 12 horas. Para a transformação foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* cepa XL1-Blue pelo método de eletroporação. Para isso foram utilizados 2 µl da reação de ligação, 2 µl de água ultrapura e 50 µl de células competentes armazenadas a -80°C. A eletroporação foi feita a 1,8 V e em seguida foram adicionados 950 µl de meio SOC e incubou-se por 1,5 hora a 37°C sob agitação. Placas de petri contendo meio de cultura LB amp (ampicilina 50 µg/ml), 40 µl de X-gal (40 µg/µl), 16 µl de IPTG (0,5 M) foram inoculadas com a cultura de células transformadas e incubadas a 37°C por 12 horas. A seleção dos clones foi direta, sendo baseada na atividade do gene da β-galactosidase. As colônias brancas (recombinantes) possuem esse gene inativo e não produzem a enzima que cliva o X-gal produzindo o azul de índigo. Os clones não recombinantes possuem esse gene ativo sendo capazes de transcrever e traduzir a enzima, o que torna as colônias azuis. A eficiência de transformação foi calculada por meio do quociente de colônias brancas sobre o total de colônias (brancas+azuis). Cada colônia branca foi repicada em duas novas placas de Petri (120 colônias/placa) contendo meio LB

amp, sendo que sobre um dos meios de cultura estava colocada uma membrana de nitrocelulose (Hybond – N, Amershan Pharmacia). Em seguida ambas as placas foram incubadas a 37°C por 12 horas (Rafalski *et al.*, 1996; Sambrook *et al.*, 1989).

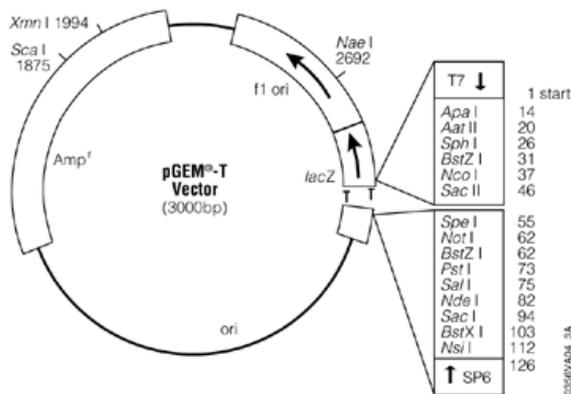


Figura 1.5. Desenho esquemático do vetor pGEM-T mostrando o *poli-linker* onde o fragmento é inserido. A inserção do fragmento implica na inativação do gene *lacZ* e formação de colônias brancas, incapazes de metabolizar o X-gal.

Seleção dos clones positivos

Para que fosse realizada a hibridização, as membranas de nitrocelulose foram submetidas ao seguinte tratamento: solução desnaturante por 5 minutos, solução neutralizante 5 minutos, solução de SSC 2x por 5 minutos, sempre sob agitação. Em seguida a membrana foi colocada sobre papel *Whatman 3M* para secar. O controle positivo foi adicionado e o DNA fixado por meio de luz UV num *crosslinker*. Feito isso as membranas foram colocadas em solução de lavagem por 30 minutos sob agitação e o excesso de colônias foi retirado esfregando as membranas. Em seguida estas foram colocadas em solução de lavagem por 10 minutos sob agitação e após a secagem foram utilizadas na hibridização para a confirmação de clones positivos para seqüências SSR utilizando sonda poli AG/TC marcada com digoxigenina. A seleção dos clones positivos foi feita por meio de seleção das colônias positivas no resultado do *southern blot*.

PCR e reação de seqüenciamento

Os clones positivos identificados na hibridização foram diluídos em 80 µl de água ultrapura estéril e expostos a 95°C por 5 minutos. Estes foram utilizados como *template* nas reações de PCR prévias às reações de seqüenciamento (Figura 1.6). Nestas PCRs foram utilizados os iniciadores *forward* e *reverse* M13 que são complementares à regiões do vetor. As reações constituíram-se de volume final de 50 µl e continha 8,0 µl de *template*, 1x de tampão 10x, 0,75 µM de iniciadores M13, 0,35 mM de dNTP, 1,3 U de Taq DNA polimerase sendo o volume completado com água ultrapura estéril. O programa da reação de PCR constituiu de uma desnaturação inicial a 95°C 5 minutos, 20 ciclos de 94°C 1 minuto, 58°C 1 minuto, 72°C 1 minuto seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos das amplificações foram purificados utilizando o protocolo de acetato de amônia e etanol: foram adicionados 10% de NaOAc 3M pH 4,8 e dois volumes de etanol absoluto em seguida incubou-se a -20°C por 30 minutos e centrifugou-se por 30 minutos a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados com etanol 70%. Após a secagem foram adicionados 10 µl de água ultrapura aos precipitados. Estes foram quantificados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizados em luz UV.

Esse produto foi utilizado como DNA *template* nas reações de seqüenciamento que foram realizadas em analisador automático de fragmentos ABI 377 (Perkin Elmer) utilizando o *Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing* (Figura 1.7). Para isso foram utilizados 600 ng de DNA, 0,5µM de iniciador *forward* ou *reverse* M13, 4 µl de pré-mix (*Big Dye Terminator*) e água ultrapura. O controle utilizado foi o DNA do plasmídeo M13. As reações foram submetidas à PCR em termociclador 9600 (Applied Biosystems) seguindo o programa 96°C 3 minutos, 25 ciclos de 96°C 20 segundos, 50°C 20 segundos e 60°C 4 minutos seguidos de uma extensão final de 60°C por 5 minutos e mantidas a 4°C até sua utilização. As reações foram purificadas antes de serem seqüenciadas (instruções do fabricante).

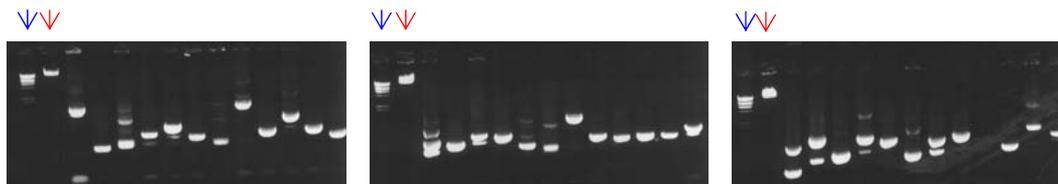


Figura 1.6. Quantificação da reação de PCR do inserto pré-reação de seqüenciamento. O produto desta PCR é purificado e utilizado como *template* na reação de seqüenciamento. As setas azuis indicam o marcador Ladder 1Kb, e as vermelhas o padrão de peso molecular λ DNA (200ng). A partir da terceira linha as reações de PCR das colônias positivas.

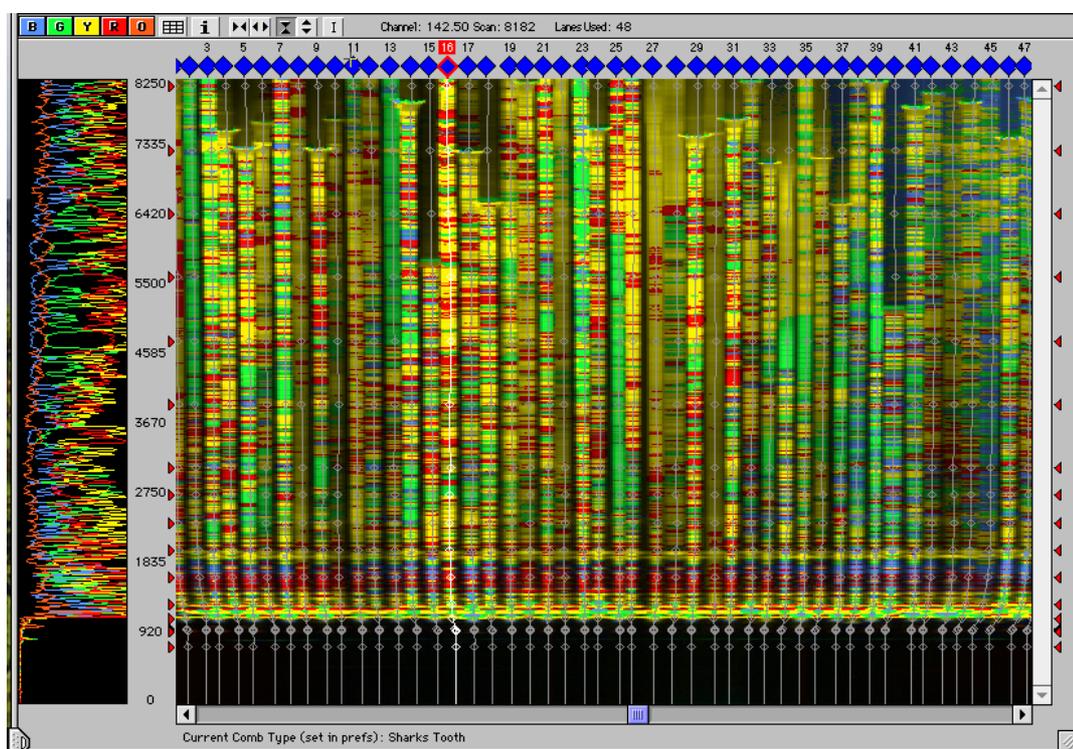


Figura 1.7. Imagem de uma eletroforese de seqüenciamento em ABI 377. Representa o primeiro passo nas análises das seqüências para um posterior desenho de iniciadores.

Desenho dos iniciadores e otimização dos locos SSR

As seqüências dos clones obtidas após o seqüenciamento foram analisadas e as que continham repetições SSR dinucleotídicas foram selecionadas para o desenho de iniciadores específicos complementares a cada região flanqueadora das seqüências SSR utilizando o Programa Primer 3 (Rozen & Skaleshy, 2000) (Figura 1.8). Os critérios utilizados para o desenho dos iniciadores foram os seguintes: temperatura média de anelamento variando entre

anelamento era variada de modo a aumentar a especificidade e eficiência de anelamento de cada par iniciadores. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio. A partir dos resultados das ampliações, as detecções de polimorfismo foram realizadas em géis desnaturantes de poliacrilamida 4% de alta resolução corados com nitrato de prata utilizando-se 12 indivíduos adultos de *M. huberi* procedentes da área de estudo na Floresta Nacional do Tapajós, Pará. Com base no grau de polimorfismo, alguns locos foram selecionados para serem utilizados nos estudos populacionais.

Análise dos dados

A interpretação dos alelos amplificados em pares de base (pb) foi realizada tendo como base um marcador de fragmentos de tamanho conhecido (Ladder 10 pb). A eficiência do processo de desenvolvimento de marcadores SSR utilizando biblioteca enriquecida foi calculada baseada no produto das três proporções a seguir: (1) proporção de clones positivos por hibridização, (2) proporção de pares de iniciadores desenhados e (3) proporção de pares de iniciadores que resultaram em ampliações de produtos discretos. As estimativas de números de alelos/loco e frequências alélicas foram calculadas diretamente dos genótipos observados. As estimativas de heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), índice de fixação (f), e os testes de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação de locos dois a dois, foram realizados utilizando-se o programa GDA - *Genetic Data Analysis* versão 1.0 (Lewis & Zaykin, 2001). Os valores de exclusão de paternidade $Pr(Ex_1)$, na ausência de ambos os genitores e $Pr(Ex_2)$, na ausência de um genitor, i.e., quando a mãe é conhecida (Slate *et al.*, 2000), foram estimados utilizando-se o programa CERVUS 2.0 (Marshall, 1998-2001). Este *software* também foi o utilizado para a estimativa de frequência de alelos nulos utilizando um algoritmo iterativo baseado na diferença entre heterozigosidades observada e esperada. Um loco que apresenta alto valor de frequência de

alelo nulo indica excesso de homozigotos, mas não necessariamente implica que há alelo nulo (Marshall *et al.*, 1998). Alelos nulos são uma causa comum de desvios aparentes do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, particularmente quando apenas um loco apresenta esse desvio. Por definição, um alelo nulo é qualquer alelo que consistentemente falha em amplificar em reações PCR (Dakin & Avise, 2004). Iniciadores desenvolvidos para ampliações de regiões microssatélites são específicos e desenhados com base em apenas um indivíduo. Alelos de outros indivíduos da mesma espécie ou de outras espécies podem apresentar variações em diferentes graus na região de anelamento do iniciador fazendo com que a amplificação falhe (Primmer *et al.*, 1995). Em geral, mutações no sítio de anelamento da região 3' do iniciador, onde a extensão tem início representam fator primordial para a ocorrência de alelos nulos (Kwok *et al.*, 1990). Outros fatores que podem levar à interpretação de existência de alelos nulos dizem respeito à competitividade característica de reações PCR que faz com que alelos menores amplifiquem de forma mais eficiente (Wattier *et al.*, 1998) e a baixa qualidade ou quantidade de DNA *template* (Gagneux *et al.*, 1997). Outras explicações possíveis para excesso de homozigotos incluem seleção contra indivíduos heterozigotos e subdivisão genética da população.

Transferibilidade para a espécie *M. multifida*

Sabe-se que a transferibilidade de locos SSR entre espécies correlatas pode ser realizada. O gênero *Manilkara* é composto por dezenas de espécies em florestas tropicais, a maioria das quais são alvos de exploração madeireira. Estas espécies estão distribuídas em diversos biomas, sendo encontradas na África, Havaí e América do Sul (Amazônia e Floresta Atlântica). Atualmente, mais de 20 espécies do gênero *Manilkara* estão listadas na *RED LIST* da IUCN, estando classificadas como vulneráveis ou em risco de extinção. Algumas espécies membros deste gênero apresentam forte semelhança morfológica, possivelmente resultado de

uma relação filogenética relativamente próxima. Essa observação pode ser traduzida em similaridade genômica suficiente entre as espécies para permitir a transferência interespecífica de marcadores microsatélites.

Com o objetivo de transferir os locos desenvolvidos para a espécie Amazônica *M. huberi*, todos os 27 pares de iniciadores foram testados em outra espécie do gênero *Manilkara* igualmente explorada pela indústria madeireira: *M. multifida* T.D. Penn., uma espécie madeireira da Mata Atlântica classificada como espécie em risco de extinção devido à intensa ação antrópica (Pires O'Brien, 1998) de modo a obter a temperatura ideal de anelamento.

Para os testes de transferibilidade, os locos SSR foram amplificados em reações PCR de 13 µl contendo: DNA (3 ng), tampão PCR 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl), iniciador *forward* (0,28 µM), e iniciador *reverse* (0,28 µM), MgCl₂ (1,5mM), BSA (0,25 mg/ml), dNTP (0,25 mM) e 1,3 unidades de Taq polimerase (Invitrogen). As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a T_a (Tabela 1.4) por 1 min, e extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 15 min. As detecções de polimorfismo foram realizadas em géis desnaturantes de poliacrilamida 4% de alta resolução, corados com nitrato de prata. O polimorfismo foi avaliado utilizando um total de 12 indivíduos adultos de *M. multifida* oriundos de uma população da Mata Atlântica em Ilhéus, BA. As amplitudes alélicas foram definidas com base no Ladder 10 pb (Invitrogen).

A média do número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e desequilíbrio de ligação foram estimados utilizando o *software* GDA – *Genetic Data Analysis* versão 1.0 (Lewis & Zaykin, 2001). Probabilidades de exclusão de paternidade ($Pr(Exc_1)$ e $Pr(Exc_2)$) foram estimadas utilizando *software* Cervus 2.0 (Marshall, 1998-2001; Marshall *et al.*, 1998).

RESULTADOS

Biblioteca genômica enriquecida para seqüências hiper-variáveis

Entre as três enzimas de restrição testadas, *Sau3A*, *MseI* e *Tsp509*, foi observado que a *Tsp509* produziu uma melhor digestão de DNA de *M. huberi* gerando grande quantidade de fragmentos com tamanho variando entre 200 e 800 pb, sendo a escolhida para a construção da biblioteca genômica. A partir de 50 µg de DNA digerido com *Tsp509*, foi possível recuperar por meio de eluição de DNA do gel de agarose cerca de 20 µg. A reação de PCR do passo de controle do enriquecimento revelou boa quantidade de DNA na solução de controle e na solução final de DNA adsorvido às contas, e revelou também que durante as lavagens não foi perdido DNA (Figura 1.4). Ambas as soluções em que a reação de PCR ocorreu hibridizaram com a sonda poli AG/TC indicando a presença de seqüências SSR.

A eficiência de transformação de células competentes *E. coli* XL1-Blue com a ligação do fragmento de DNA ao plasmídeo foi de 75% (Figura 1.9). De 480 colônias brancas repicadas nas placas contendo meio LB amp + Xgal e IPTG, 271 (56%) foram consideradas positivas após os resultados de hibridização com a sonda poli AG/TC (Figura 1.9) e destes, 251 foram seqüenciados.

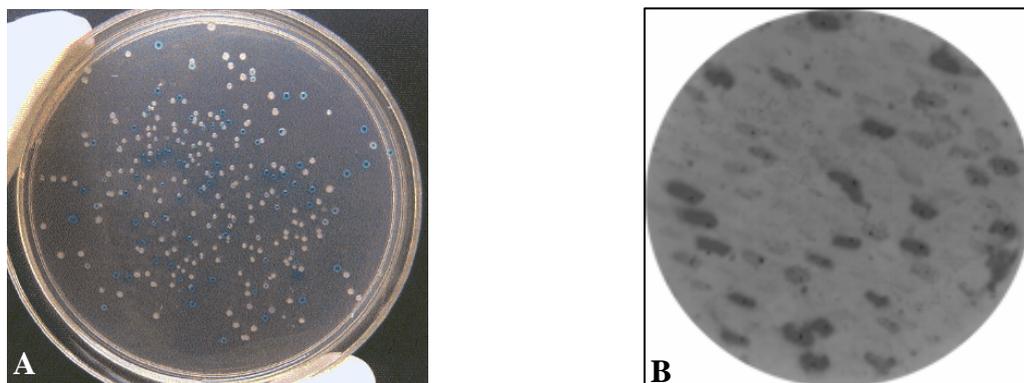


Figura 1.9. A) Exemplo de transformação de células competentes de *E. coli*. As colônias brancas representam os clones positivos que foram repicados em duas novas placas. B) Resultado de *Southern blot*. Imagem do filme ao qual foi exposta a membrana hibridizada com sonda TC₁₃. Os pontos escuros representam colônias positivas.

Seqüenciamento de clones e triagem de pares de iniciadores

Os resultados do seqüenciamento (Figura 1.10) dos clones selecionados por hibridização com sonda poli AG/TC indicaram 29 (11,55%) clones adequados ao desenho de iniciadores, sendo 27 com seqüências SSR inéditas. As seqüências remanescentes foram descartadas por ausência de SSR; redundância; SSRs no início das seqüências, próximo ao adaptador, impossibilitando o desenho de iniciadores; SSRs não dinuclotídicos; clones com regiões de sinal dúbio, ou seja, incerteza na identificação completa da seqüências de bases nitrogenadas; seqüências com repetições SSR curtas; percentagem de GC abaixo de 40% nas regiões flanqueadoras. Um loco (Mh26) apresentou desenho de iniciador adentrando o SSR.

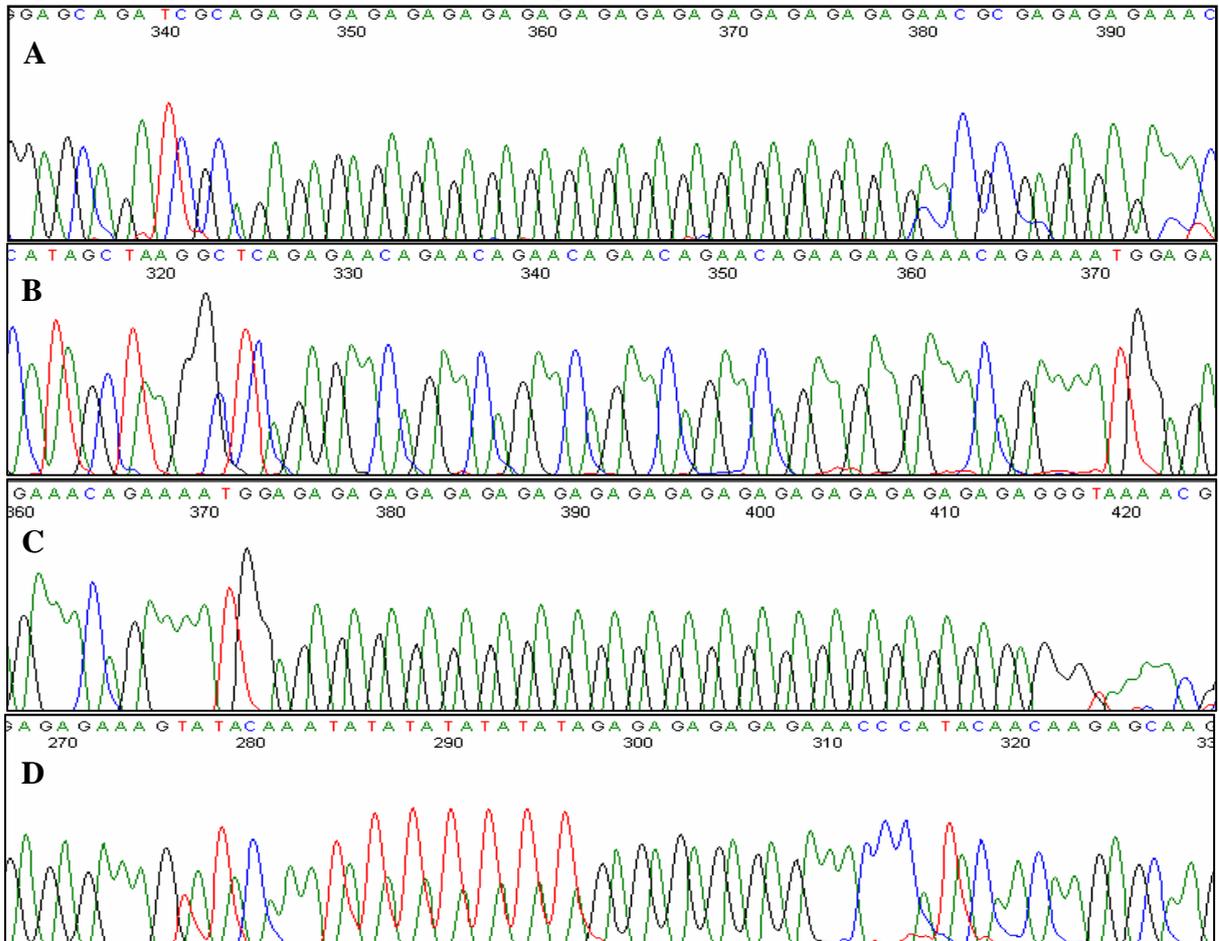


Figura 1.10. Eletroferogramas de seqüências que contém SSR. **A)** SSR perfeito. **B)** SSRs de outra classe, (GAACA). **C)** Diminuição de intensidade logo após o SSR dificultando o desenho de iniciadores. **D)** Exemplo de um SSR composto TA/GA, forma também comumente encontrada.

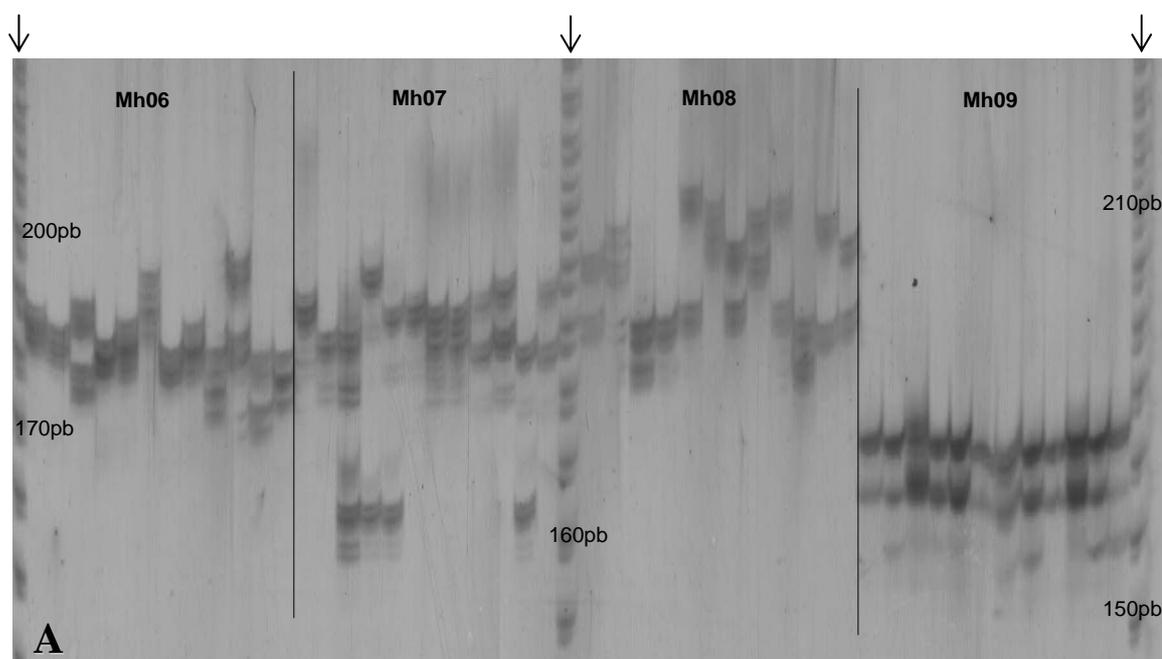
depositadas no Gene-Bank e estão disponíveis. A Tabela 1.2 apresenta as seqüências dos iniciadores e número de acesso no Gene-bank.

A maioria dos iniciadores apresentou temperatura de anelamento de 56°C o que é extremamente vantajoso para a montagem de sistemas multiplex, onde vários locos são analisados simultaneamente a partir de uma única reação de PCR ou de PCRs independentes e seguidas de um único gel de eletroforese. A amplitude alélica variou entre 134 e 274 pb (Tabela 1.3).

Tabela 1.2. Informações sobre os doze locos polimórficos, indicando o motivo repetitivo, a seqüência dos iniciadores, A se refere ao número de alelos, o tamanho de fragmento esperado de acordo com o *software* Primer3 e o número de acesso no Gene-Bank.

Loco	SSR	Seqüência do iniciador (5' – 3')	A	Tamanho esperado	n°. Gene Bank
Mh02	(CT) ₉	F: CCTTTTCCCGCAAATCCT R: GGGCTGAGACCAATGTCAAT	4	155	DQ923496
Mh 03	(CT) ₁₇	F: CACTTCTGTCTCTCTCCTCGT R: GGGTGATTGCAGAGACGTA	7	194	AY514005
Mh 04	(CT) ₁₂	F: GCACTCTCCATGGTTCCAGT R: AAAGAGTCAATGGCGTGAGC	5	183	AY514006
Mh 06	(GA) ₁₄	F: ACACGCACAAAACAAACCAA R: TTCTGAAGGAGGGTTGCTC	7	172	AY514007
Mh 07	(CT) ₂₃	F: ATTGCAGCATATCCACACCA R: GCAAAGGGTGATGGGTTAGA	4	183	AY514008
Mh 08	(CT) ₁₁	F: GTAATGGGAGCCGTTTGAGA R: CTGGGTAGCATTGTGTCAT	7	180	AY514009
Mh 12	(CT) ₉ (AC) ₆	F: TGCGGAAGTGTGGAAAGAGT R: ATCCACAGCAATGACTGACG	7	195	AY514010
Mh13	(CT) ₁₁	F: TTGTCCCACAAGATCCCATC R: TGTTGCCGTCGATTAACAAG	4	151	DQ923498
Mh 17	(CT) ₁₃	F: CACGATGACCTCTCAGTGGA R: CCTGTGTATGCGTTCGATTG	6	226	AY514011
Mh 19	(CT) ₂₁	F: AATTACAACCAAAGCTCCACTT R: TGAGAGTCTTTTCGCACTTCA	7	170	AY514012
Mh 20	(GA) ₁₃	F: GAAGTTTTGACCATTTGGGAAT R: GACATAACACTAACCCTTCACGA	8	150	AY514013
Mh 22	(CT) ₁₅	F: CCCATTATAGCCCTCCACCT R: AGAGAGCACATGCAAGCTCA	7	180	AY514014
Mh 24	(CT) ₁₇	F: CCACTTCTGTCTCTCCTCGT R: GACATTGTGGGTGATTGCAG	7	201	AY514015
Mh 26	(CT) ₁₄	F: TGCTCAGACTGCTTTCTTTTTG R: TGCAATAAGTGTGATTTGGAGAA	6	230	AY514016

Mesmo após a triagem de seqüências no processo de desenho dos iniciadores, foi observado no processo de otimização que ainda havia dois pares de clones que apresentavam seqüências redundantes. O Mh15 e Mh16, que já haviam sido descartados por não amplificarem corretamente, e os clones que geraram os locos Mh03 e Mh24, ambos polimórficos, porém com padrão distinto. Pequenas diferenças na seqüência e desvio no desenho de um dos iniciadores geraram tamanhos de fragmento esperados diferentes entre os locos. Além disso, foram observadas diferenças na otimização o que levou os dois locos a temperaturas de anelamento diferentes. Para o loco Mh03 a temperatura de anelamento ideal foi a de 56°C (Figura 1.11B). O loco Mh24 por sua vez, quando amplificado com temperatura de anelamento de 56°C, gerou uma série de bandas inespecíficas (Figura 1.11E) e foi determinado como temperatura de anelamento ideal para esse loco 60°C (Figura 1.11B). Padrão de bandas, temperatura de anelamento e amplitude alélica diferentes foram observados, e após uma nova conferência das seqüências observou-se que se tratavam do mesmo loco. Devido à falha em amplificar alguns alelos, o loco Mh24 foi desconsiderado. Sendo considerado no total 13 locos polimórficos.



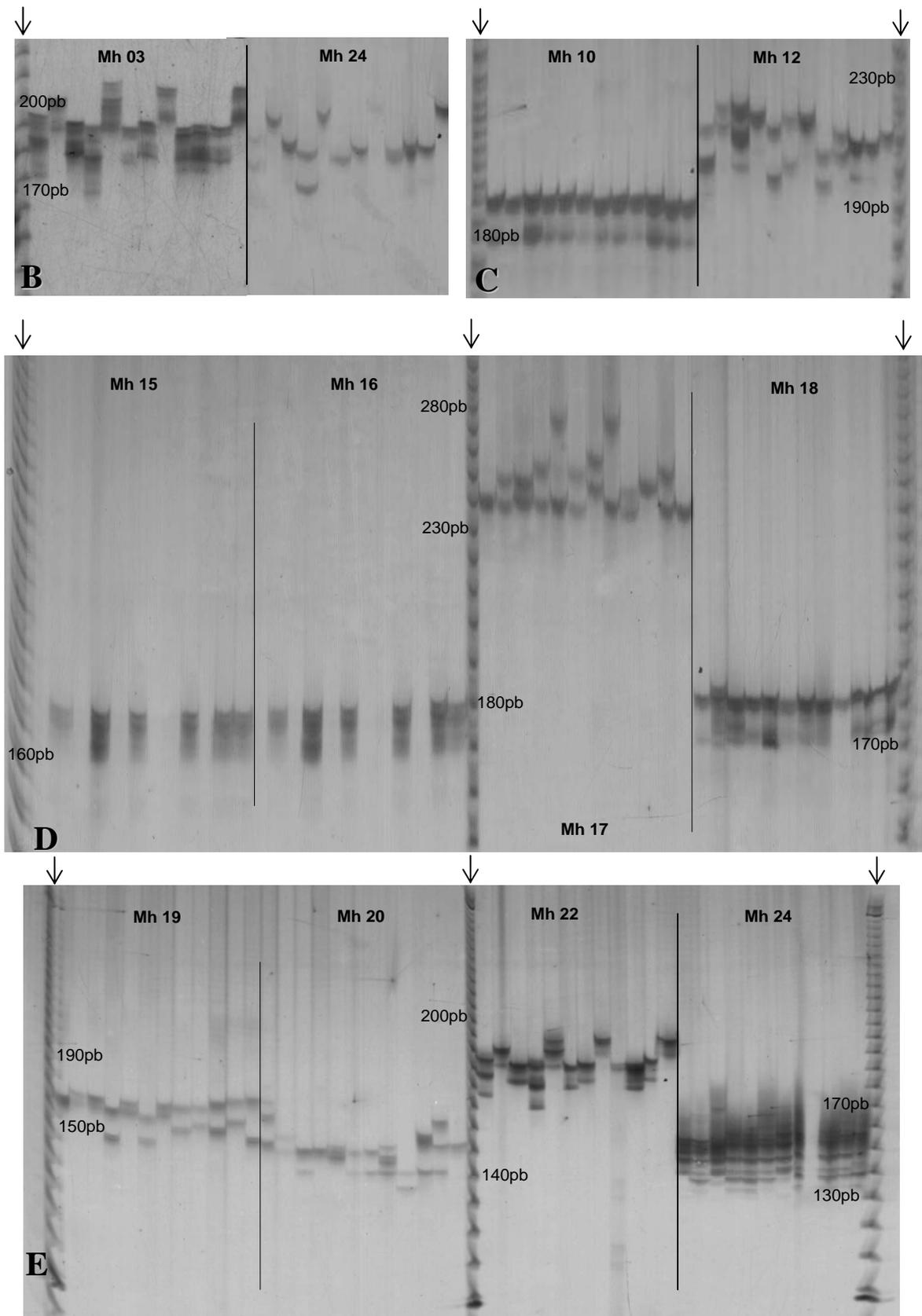


Figura 1.11. Géis desnaturantes de poliacrilamida 4% corados com nitrato de prata. **A)** Locos, Mh06, Mh07, Mh08 e Mh09 ($T_a=56^\circ\text{C}$). **B)** Loco Mh 03 ($T_a=56^\circ\text{C}$). Loco Mh24 ($T_a=60^\circ\text{C}$). **C)** Locos Mh10 e Mh12 ($T_a=56^\circ\text{C}$). **D)** Locos Mh15, Mh16, Mh17 e Mh18 ($T_a=56^\circ\text{C}$). **E)** Locos Mh19, Mh20, Mh22 e Mh24 ($T_a=56^\circ\text{C}$). Mh24 apresentou bandas inespecíficas à 56°C . As setas superiores indicam o marcado Ladder 10 pb.

Análises estatísticas

A eficiência da construção da biblioteca enriquecida foi de 4,7% ($0,5646 \times 0,1076 \times 0,778 = 0,047$) e a eficiência em gerar locos polimórficos passíveis de serem utilizados foi de 2,9% ($0,5646 \times 0,1076 \times 0,4815 = 0,029$). Os valores de heterozigosidade esperada (H_e) variaram entre 0,634 e 0,862, gerando uma média para os treze locos polimórficos de 0,787 e de heterozigosidade observada (H_o) variaram entre 0,417 e 1,0, com média de 0,750. Nenhum desequilíbrio de ligação entre locos dois a dois foi detectado. O índice de fixação não foi significativo. Alta frequência de alelos nulos foi estimada para o loco Mh06 (0,298), para os demais locos as frequências de alelos nulos ficaram abaixo de 0,2. A estimativa de exclusão de paternidade a priori na ausência de ambos os genitores, $Pr(Ex_1)$, variou de 0,193 a 0,5, gerando um poder de exclusão de 0,999 para os locos combinados. A estimativa de exclusão de paternidade a priori na ausência de um dos genitores, $Pr(Ex_2)$, variou de 0,326 a 0,672 e gerou um poder de exclusão de 0,999998 para os locos combinados.

Tabela 1.3. Informações sobre 13 locos SSR de *M. huberi* com base na análise de 12 indivíduos.

Loco	Amplitude alélica pb	T _a °C	A	H _e	H _o	f	Pr(Ex ₁)	Pr(Ex ₂)
Mh02	149-159	56	4	0,634	1,000	-0,620	0,193	0,326
Mh03	176-204	56	7	0,859	1,000	-0,173	0,477	0,650
Mh04	189-209	52	5	0,768	0,583	0,249	0,319	0,492
Mh06	162-188	56	7	0,754	0,417	0,458	0,325	0,502
Mh07	153-187	56	4	0,746	0,750	-0,005	0,300	0,473
Mh08	172-202	56	7	0,862	0,917	-0,066	0,485	0,659
Mh12	187-211	56	7	0,859	0,667	0,231	0,481	0,655
Mh13	149-171	52	4	0,659	0,667	-0,011	0,210	0,356
Mh17	240-274	56	6	0,721	0,750	-0,042	0,295	0,480
Mh19	146-164	56	7	0,862	0,750	0,135	0,500	0,672
Mh20	134-166	56	8	0,848	0,833	0,018	0,458	0,632
Mh22	180-206	56	7	0,841	0,833	0,009	0,449	0,627
Mh26	224-250	58	6	0,819	0,583	0,297	0,400	0,579
Média			6,08	0,787	0,750	0,047	0,999	0,999998
Superior						0,175		
Inferior						-0,094		

Temperatura de anelamento (T_a°C), heterozigidade esperada (H_e), heterozigidade observada (H_o), índice de fixação (f) e o intervalo de confiança a 95%, probabilidades de exclusão de paternidade (Pr(Ex₁) e Pr(Ex₂)).

Transferibilidade para *M. multifida*

Dentre os 27 locos testados para a transferibilidade para a espécie *M. multifida* de ocorrência na Mata Atlântica, 24 (88,89%) amplificaram e foram visualizados em gel de agarose 3,5%. Na detecção de polimorfismo em gel desnaturante de poliacrilamida, sete não apresentaram alelos facilmente interpretáveis, oito apresentaram padrão monomórfico e nove locos apresentaram polimorfismo (Figura 1.12). Dentre estes, dois apresentaram padrão monomórficos em *M. huberi*.

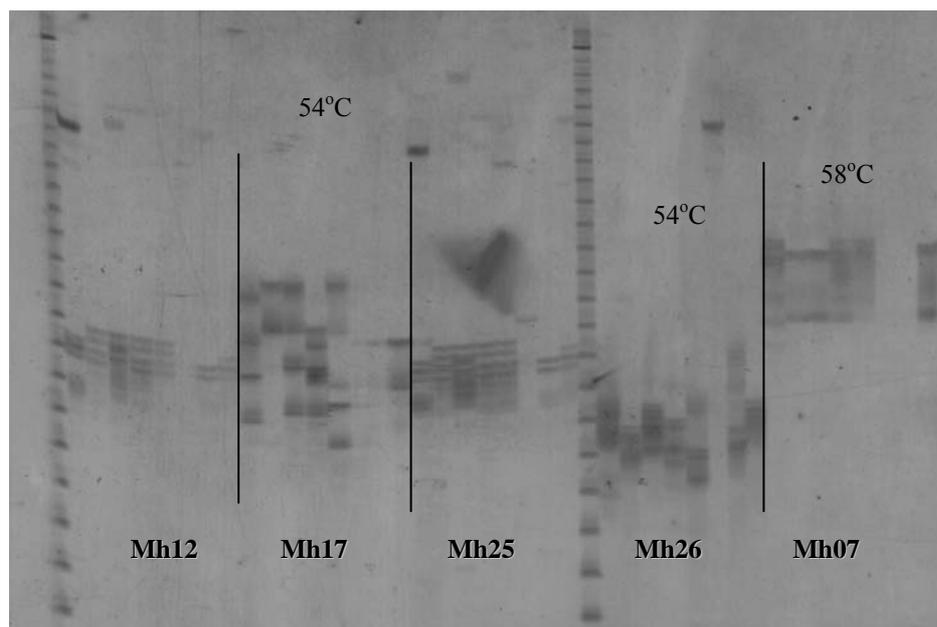


Figura 1.12. Gel desnaturante de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata da transferibilidade para *M. multifida*.

Foram transferidos de forma eficiente e são polimórficos os locos: Mh02, Mh04, Mh05, Mh06, Mh08, Mh12, Mh15, Mh22, Mh26. As estimativas obtidas das análises com os locos transferidos estão na tabela 1.4.

Tabela 1.4. Informações sobre os marcadores microsatélites transferidos estimadas de uma amostragem de 12 árvores.

Locos	SSR	Seqüência do iniciador (5' - 3')	Amplitude alélica (pb)	T _a °C	A	H _e	H _o	P _r (Ex ₁)	P _r (Ex ₂)	no. Gene-Bank
Mh02	(CT) ₉	F CCTTTCCCGCAAATCCT R GGGCTGAGACCAATGTCAAT	176-204	56	3	0,712	0,500	0,439	0,616	DQ923496
Mh04	(CT) ₁₂	F GCACTCTCCATGGTTCCAGT R AAAGAGTCAATGGCGTGAGC	184-210	54	5	0,822	0,600	0,336	0,516	AY514006
Mh05	(CT) ₁₃	F TCCGCTCAAGCTTATCAATG R ACTAGGGACCGAAAAGGAA	140-190	54	6	0,813	0,714	0,362	0,540	DQ923497
Mh06	(GA) ₁₄	F ACACGCACAAAACAAACCAA R TTCTTGAAGGAGGGTTGCTC	180-200	54	5	0,809	0,643	0,319	0,499	AY514007
Mh08	(CT) ₁₁	F GTAATGGGAGCCGTTTGAGA R CTGGGTAGCATTTGTTGCAT	168-202	54	7	0,901	0,429	0,500	0,671	AY514009
Mh12	(CT) ₉ (AC) ₆	F TGC GGAACTGTGGAAAGAGT R ATCCACAGCAATGACTGACG	168-184	54	3	0,591	0,833	0,147	0,265	AY514010
Mh15	(CT) ₁₆	F CTTCTGGCTCACAGGCTACA R TGGATCCAGTCACACCTACG	162-220	50	8	0,890	0,571	0,490	0,662	DQ923499
Mh22	(CT) ₁₅	F CCCATTATAGCCCTCCACCT R AGAGAGCACATGCAAGCTCA	140-190	54	7	0,813	0,714	0,380	0,565	AY514014
Mh26	(CT) ₁₄	F TGCTCAGACTGCTTTCTTTTGG R TGCAATAAGTGTGATTTGGAGAA	220-230	54	6	0,857	0,857	0,418	0,597	AY514016
Média					5	0,773	0,686	0,9903	0,9998	

Temperatura de anelamento (T_a), número total de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), probabilidades de exclusão de paternidade (P_r(Ex₁) e P_r(Ex₂))

DISCUSSÃO

Eficiência da metodologia utilizada

Esses resultados mostram que seqüências repetitivas de CT são freqüentes no genoma de *M. huberi* e passíveis de isolamento para o desenvolvimento de marcadores microssatélites. Pares de iniciadores foram desenhados para 11,55% dos clones seqüenciados, uma vez que somente as seqüências perfeitas foram utilizadas. Estes resultados são pouco inferiores aos observados em outras espécies que utilizaram o mesmo protocolo de construção de biblioteca genômica enriquecida, como 14,4% para *Caryocar brasiliensis* (Collevatti *et al.*, 1999), 16% para *Copaifera langsdorffii* (Ciampi *et al.*, 2000) e 15% para *Bagassa guianensis*, 17% para *Dipterix odorata* e 14% para *Jacaranda copaia* (Vinson, 2004). A seleção de clones por PCR ancorado antes do seqüenciamento teria sido uma opção vantajosa e significaria seqüenciar menor quantidade de clones em troca de maior número de seqüências adequadas para o desenho de iniciadores, excluindo, e.g., falsos positivos e seqüências positivas que têm motivos SSR muito próximos ao vetor. No entanto considerando a alta heterozigosidade esperada (H_e) e os objetivos da pesquisa, a metodologia utilizada permitiu a obtenção de um número plenamente adequado para atender aos objetivos do estudo.

Da bateria de iniciadores sintetizados, 78% produziram produtos amplificados. Esta eficiência está de acordo com o que é relatado na literatura, 87, 62 e 86% para *B. guianensis*, *D. odorata* e *J. copaia* respectivamente (Vinson, 2004) e 77% para *Capsicum spp.* (Buso *et al.*, 2000). A eficiência de todo o processo de desenvolvimento de SSRs de 4,7% está um pouco abaixo do observado para *Eucalyptus grandis* (8,8%) e *E. urophylla* (6,3%) (Brondani *et al.*, 1998), para *Copaifera langsdorffii* (7,5%) (Ciampi *et al.*, 2000) e para a espécie madeireira *Bagassa guianensis* (5,6%) (Vinson, 2004). A eficiência do desenvolvimento em

gerar marcadores informativos ou polimórficos foi de 2,9%, significativamente superior aos obtidos em metodologias que não utilizam o enriquecimento (0,2%) (Condit & Hubbell, 1991) *apud* (White & Powell, 1997).

Detecção do polimorfismo e genotipagem

A detecção do polimorfismo em gel desnaturante de poliacrilamida corado com nitrato de prata foi eficiente, sendo esta uma tecnologia de fácil acesso, rápida e que não exige DNA de alta qualidade. Essa metodologia permitiu discriminar com precisão entre locos polimórficos, monomórficos ou locos que apresentavam ampliações inespecíficas. Por outro lado, essa técnica não permite uma discriminação precisa na determinação dos tamanhos dos alelos, especialmente em se tratando de fragmentos que podem variar em apenas duas bases nitrogenadas. Baseado nisso, para análises populacionais detalhadas torna-se imprescindível a genotipagem com detecção de fluorescência em analisador automático de fragmentos. Apesar de esta metodologia ser relativamente cara, ela permite uma discriminação precisa dos tamanhos dos alelos, e é prática por favorecer a montagem de sistemas *multiplex* para genotipagem de vários locos numa mesma pista de gel. A temperatura de anelamento otimizada para a maioria dos locos foi de 56°C e as amplitudes alélicas observadas variaram entre si, fatores estes que podem favorecer a montagem destes sistemas *multiplex*.

No entanto, apesar da limitação dos géis desnaturantes de poliacrilamida com coloração em nitrato de prata, os dados indicam que os marcadores SSR do genoma de *M. huberi* são multi-alélicos, com alto poder na identificação de genótipos, o que os torna uma ferramenta eficiente nos estudos envolvendo genética de populações. Uma vez desenvolvidos os iniciadores, esse tipo de marcador torna-se prático para análises genéticas, sendo de fácil

utilização e custo reduzido, podendo ser empregados em laboratórios que conduzam trabalhos com amplificação de DNA por PCR.

Alelos de microssatélites amplificados por PCR podem apresentar em alguns casos mais de uma banda no gel. Essa banda adicional usualmente menor do que o alelo original, é oriunda do fenômeno de gaguejamento (*stutter*) durante a polimerização realizada pela Taq polimerase e diferem no comprimento por diferença nas unidades de repetição. Este fenômeno é equivalente ao escorregamento do DNA (*slippage*) *in vivo*, fenômeno este tido como principal responsável pela evolução de microssatélites. Esse gaguejamento *in vitro* tende a ser mais freqüente em unidades de dinucleotídeos. Além da presença de bandas adicionais derivadas de *stutter*, na detecção com nitrato de prata são visualizadas ambas as fitas do DNA. Caso a composição de bases das duas fitas seja tal que a migração das mesmas seja significativamente diferente, são observadas duas bandas o que contribui para uma maior dificuldade na correta interpretação de alelos.

Análise dos dados

Níveis de multialelismo relativamente altos foram detectados (6,08 alelos para 13 locos) especialmente se for considerado que a detecção de polimorfismo foi realizada utilizando-se apenas 12 indivíduos vizinhos na floresta. Muito provavelmente, com o aumento da amostragem e da área amostrada, um maior número de alelos por loco deverá ser detectado. Nenhum par de locos apresentou desequilíbrio de ligação significativo. O índice de fixação médio dentro da população foi positivo (0,047), porém não significativamente diferente de zero. Este resultado deve ser considerado com cuidado tendo em vista a amostragem limitada de indivíduos para esta estimativa. Foi observada uma heterozigosidade observada menor do que a esperada de acordo com Hardy-Weinberg. O loco Mh06 apresentou desvio desse equilíbrio, o que pode ser devido à amostragem ou a ocorrência

freqüente de alelos nulos. Estimativas de freqüências de alelos nulos neste loco foi elevada (0,298).

A análise detalhada dos locos revelou que o loco Mh24 era na verdade o mesmo loco denominado Mh03 devido à redundância no momento da seleção de clones contendo microssatélites. Quando testados à mesma temperatura de anelamento, o padrão de amplificação era muito diferente (Figura 1.11C e D) de modo que o loco Mh24 apresentava uma série de bandas inespecíficas. Quando exposto à temperatura de anelamento mais elevada a inespecificidade foi eliminada, porém a amplificação de alguns alelos não ocorreu. Este resultado levou à conclusão a respeito da presença de alelos nulos, alelos cuja amplificação ocasionalmente falha não gerando o produto devido à ocorrência de mutação de ponto ou inserção/deleção no sítio ou entre os sítios de anelamento dos iniciadores (White & Powell, 1997). Uma vez que a redundância foi detectada, o loco Mh04 foi descartado.

Restaram ainda 13 locos polimórficos para os estudos populacionais. As estimativas de exclusão de paternidade indicaram que com esses locos permite-se excluir um falso pai com probabilidade de 99,9998%. No entanto, cuidado deve ser tomado ao se utilizar locos com estimativas de alta freqüência de alelos nulos devido à possibilidade de se excluir erroneamente um verdadeiro pai ou de não excluir um falso pai. O loco Mh06 apresentou alta taxa de freqüência de alelos nulos, entretanto, devido à baixa amostragem, este valor pode não ser significativo.

Transferibilidade para *M. multifida*

A transferibilidade de locos SSR entre espécies relacionadas é uma consequência da homologia das regiões flaqueadoras dos microssatélites. Estudos como os realizados para espécies de *Eucalyptus* (Brondani *et al.*, 1998), para a família Meliaceae (White & Powell,

1997) e de transferibilidade de *Eucalyptus* spp. para *Eugenia dysenterica* (Zucchi, 2002) confirmam a eficiência da transferibilidade.

Após otimização, nove locos foram eficientemente transferidos e apresentaram polimorfismo em *M. multifida*. Os resultados encontrados mostram que esta espécie apresenta uma homologia genômica suficientemente ampla com *M. huberi* que permite a transferibilidade de marcadores microssatélites entre estas espécies. Dois marcadores, que apresentaram monomorfismo na espécie alvo do desenvolvimento apresentaram polimorfismo nas outra espécie testada.

Devido à taxa relativamente alta de multialelismo observada, essa bateria de marcadores transferidos é capaz de proporcionar estudos moleculares com potencial de discriminação individual de alta precisão em estudos de genética de populações com a espécie.

CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver uma bateria de marcadores microssatélites polimórficos para *M. huberi* seguindo a metodologia padrão de construção e enriquecimento de bibliotecas genômicas. No entanto é necessário verificar com cuidado a possível redundância entre clones selecionados antes de desenhar iniciadores.

Os marcadores desenvolvidos detectaram a elevada heterozigosidade existente aos locos microssatélites permitindo assim uma discriminação individual precisa para estudos populacionais. Os resultados indicam que estes locos podem ser muito úteis em investigações de paternidade, fluxo gênico e estrutura genética espacial, abrindo nova perspectiva para geração de dados que podem contribuir para a conservação da espécie e de espécies do mesmo gênero. Nesse âmbito, podem ser eficientemente utilizados nos sistemas de avaliação da sustentabilidade dos planos de manejo, validando estudos de modelagem.

A transferibilidade permitiu disponibilizar a ferramenta para estudos populacionais com outra espécie, e os resultados são um indicativo de que a transferibilidade para outras espécies do gênero também é possível.

Estrutura genética espacial, sistema de cruzamento e fluxo gênico em uma população natural de *Manilkara huberi* (Ducke) A.Chev.

Azevedo, V.C.R.; Kanashiro, M.; Ciampi, A.Y.; Grattapaglia, D. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a heavily logged Amazonian timber species. **The Journal of Heredity**, 2007 (no prelo).

RESUMO

O desmatamento e a exploração predatória da madeira na floresta amazônica fazem com que seja necessária a promoção de um manejo florestal sustentável baseado não somente em dados dendrométricos, mas que leve em consideração também dados genéticos. Dentre muitas espécies florestais sob manejo no Brasil, a maçaranduba - *Manilkara huberi* (Sapotaceae), é uma espécie madeireira intensamente explorada devido à dureza e alta resistência de sua madeira. Esse trabalho teve como objetivo o estudo da estrutura e dinâmica genética de uma população dessa espécie. O estudo foi conduzido em uma área de 200 hectares sob monitoramento na Floresta Nacional do Tapajós, Belterra, PA. A análise genética populacional foi realizada utilizando marcadores microssatélites com detecção fluorescente. Foi utilizada a estratégia de iniciadores com cauda e sistemas *multiplex*, utilizando-se sete locos microssatélites em 481 árvores com DAP acima de 10 cm, 88 regenerantes e 810 sementes coletadas de polinização aberta de 27 árvores da população. Para adultos, regenerantes e descendentes respectivamente as seguintes estimativas foram obtidas: $H_e = 0,867, 0,840$ e $0,811$. Os índices de fixação para as três gerações foram significativamente diferentes de zero ($f = 0,221, 0,303$ e $0,237$), porém não estatisticamente diferentes entre si (IC 95%). Foi detectada estruturação genética espacial significativa, num raio de até aproximadamente 450 metros. Os altos índices de fixação estimados sugerem cruzamentos entre indivíduos aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 28\%$). A taxa de cruzamento multiloco foi alta ($\hat{t}_m = 0,995$) e o fluxo de pólen (δ) restrito (49,5 m). Esses estudos mostraram que a espécie embora predominantemente alógama apresenta taxas expressivas de cruzamento biparental possivelmente em função de um fluxo de pólen restrito. Os resultados sugerem padrão de isolamento por distância e que programas de manejo e conservação *in situ* devem incluir grandes áreas, procurando evitar a fragmentação. As análises genéticas revelaram ainda que para conservação *ex situ*, sementes devem ser coletadas de pelo menos 188 árvores maternas para que seja preservado um tamanho efetivo de 500.

Palavras chave: SSR, diversidade genética, fluxo gênico, taxa de cruzamento.

INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica cobre cerca de 40% do território nacional e se constitui numa das maiores reservas mundiais de biodiversidade, sendo composta por cerca de 4.000 a 5.000 espécies arbóreas na Amazônia (Rodrigues, 1989) *apud* (Ferraz *et al.*, 2004) muitas exploradas comercialmente devido ao seu valor madeireiro. Contudo, a exploração ao longo das décadas tem se dado de forma irracional e insustentável causando prejuízos ao país e especialmente ao meio ambiente.

Nas últimas décadas a Amazônia assumiu a liderança em produção de madeira no país o que se deve principalmente ao fato da exaustão das florestas do sul e sudeste do país (Veríssimo *et al.*, 1996). Associado a essa exploração a floresta tem sido convertida em pastagens e grandes áreas de plantações (Asner *et al.*, 2005).

A exploração de recursos florestais como extração de madeira por meio de corte seletivo de árvores, leva a fragmentação de habitats ou diminuição drástica no número de indivíduos reprodutivos conduzindo a sérias conseqüências a longo prazo na manutenção da diversidade e sobrevivência de plantas (Young *et al.*, 1996) como mudanças no fluxo gênico e alterações nos padrões de cruzamento. A fragmentação florestal é particularmente freqüente em florestas tropicais, e são esses habitats que possuem os maiores níveis de biodiversidade. A retirada seletiva de árvores pode aumentar a endogamia pela redução do tamanho populacional e isolamento espacial dos indivíduos, predispondo os remanescentes a realizarem autofecundações pelo aumento da distância entre eles (Young *et al.*, 1996). Embora a exploração das florestas tropicais seja comum, pouco se sabe sobre o seu efeito nos sistemas de cruzamento, fluxo gênico (fluxo de pólen e dispersão de sementes) e diversidade genética.

M. huberi, conhecida como maçaranduba é uma espécie arbórea nativa da Floresta Amazônica, pertencente à família Sapotaceae. A espécie atinge até 50 metros de altura, possui tronco ereto e cilíndrico de até 2 m de diâmetro. Esta é uma das espécies arbóreas amazônicas de maior ocorrência e de crescimento muito lento. No grupo sucessional é considerada espécie clímax, é hermafrodita e sua floração ocorre em intervalos alternados de 3 a 5 anos. Uma vez que possui uma das madeiras mais duras e resistentes apresenta alto potencial de utilização na indústria madeireira e devido a isso *M. huberi* é uma das espécies que se encontram sob manejo na Amazônia (Dendrogene, 2004).

A constituição genética de um organismo é estreitamente correlacionada com as suas características ecológicas (Loveless & Hamrick, 1984). O que hoje se mede e interpreta em termos de quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações é função da biogeografia, isolamento, fluxo gênico, mudanças no tamanho populacional, distribuição do habitat e padrões de seleção que originaram a estrutura genética das atuais populações (Loveless, 2002).

Isto é o que possibilita, baseado nas informações da constituição genética atual das espécies, inferir sobre a história futura destas populações, por meio da avaliação dos eventos que alteram o número de indivíduos, a sua densidade populacional, o seu sistema de cruzamento e a sua distribuição no habitat. O manejo florestal, neste sentido, pode ser considerado um evento que possibilita todas essas alterações. Daí a importância dos estudos dos padrões reprodutivos e dos processos genéticos das espécies que são submetidas ao manejo e os seus possíveis impactos nas populações remanescentes. Uma das alterações mais evidentes da retirada de árvores madeireiras da floresta é a diminuição no número de indivíduos na população, principalmente os reprodutivos, cujos efeitos na dinâmica biológica podem ser a deriva genética e o aumento da endogamia.

O fluxo gênico restrito ou interrompido dentro e entre populações causa um aumento de diferenciação e estruturação genética populacional. No caso de pequenos números de árvores isoladas em fragmentos florestais, por sucessivas gerações, haverá diminuição da diversidade genética, com a variação entre os fragmentos aumentada, devido à deriva genética, sendo que a subsequente extinção de populações individualizadas poderá representar uma perda de variação ao nível de espécie. Em outras palavras, o fluxo gênico não somente influencia a estrutura genética, mas também define os limites da própria população (Nason & Hamrick, 1997). Outra possível consequência da redução do tamanho populacional de árvores florestais é a endogamia, causada por autofecundações ou cruzamento entre indivíduos aparentados.

Um amplo conhecimento das características demográficas, da dinâmica populacional (Matos & Watkinson, 1999) e da genética da espécie (Reis *et al.*, 1997; Ciampi *et al.*, 2000) são fundamentais para a conservação pelo manejo sustentável. No entanto o componente genético, que é o fator responsável pelas diferenças em produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos de uma mesma espécie não tem sido considerado nos programas de manejo de florestas tropicais (Sebbenn *et al.*, 2000a). Estudos genéticos de espécies arbóreas manejadas com o objetivo de avaliar o impacto que a exploração pode ter causado e pode vir a causar são fundamentais, podendo-se definir estratégias de manejo adequadas para cada espécie que permitam a conservação da maior diversidade genética possível.

O uso da biologia molecular está sendo determinante nos estudos sobre a variabilidade genética das populações e na estimativa da diferenciação genética existente entre as espécies. Isto se deve principalmente aos avanços significativos na área de marcadores moleculares aliados à PCR, que vem possibilitando a ampliação dos conhecimentos sobre espécies nativas. Marcadores SSRs ou microssatélites têm sido utilizados nos estudos de populações naturais (e.g. Dayanandan *et al.*, 1999; Konuma *et al.*, 2000; Collevatti *et al.*, 2001; Dick *et al.*, 2003) uma vez que são altamente polimórficos

quando comparados com outras classes de marcadores, podendo responder a diversas questões sobre a genética de populações como estrutura genética espacial, sistema de cruzamento e análises de paternidade.

Os microssatélites são abundantes e estão dispersos nos genomas eucariotos, em regiões codificadoras e não codificadoras; possuem herança codominante, o que discrimina homozigotos de heterozigotos; são multialélicos, altamente polimórficos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco entre todas as classes de marcadores moleculares e são detectáveis por meio de PCR; altamente reproduzíveis; não requerem radioatividade; os locos são freqüentemente conservados entre espécies relacionadas, podendo ser transferidos e uma vez desenvolvidos podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios. Todas essas características tornam a utilização deste marcador vantajosa, fazendo com que possa ser considerado próximo de um marcador ideal. Os SSRs são ainda automatizáveis em sistemas *multiplex*, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos a curto prazo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar a estrutura genética de *M. huberi* tendo como meta o uso sustentável e a conservação dos recursos genéticos desta espécie de florestas tropicais úmidas da região da Amazônia Brasileira por métodos *in situ* e *ex situ*. Essas informações servirão como base de dados da Versão Tropical do Programa Eco-Gene que visa analisar os impactos antrópicos ao sistema genético de espécies arbóreas florestais.

Objetivos específicos

- ✓ Estimar a diversidade genética e o índice de fixação da espécie, comparando-se os valores obtidos entre as três gerações amostradas: adultos, regenerantes e sementes;
- ✓ Avaliar a distribuição genética espacial dos indivíduos, e determinar se há estruturação genética;
- ✓ Determinar o fluxo gênico por meio de estimativa de distância de fluxo de pólen em famílias de meios-irmãos.
- ✓ Analisar o sistema de cruzamento;
- ✓ Identificar número mínimo de árvores maternas para coleta de sementes de modo a preservar tamanho efetivo mínimo de 500.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo, amostragem e material vegetal

A população de *M. huberi* estudada localiza-se em 500 hectares de floresta primária de terra-firme da Amazônia Brasileira, em área da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA Tapajós), na altura do km 83 da BR 163, Rodovia Santarém-Cuiabá, Belterra-PA (Figura 2.1). Esta área faz parte de uma PEI (Parcela de Estudos Intensivos) destinada a estudos no âmbito do projeto Dendrogene (Embrapa Amazônia Oriental/DFID), antes e após a exploração madeireira. A amostra populacional para os estudos genéticos constituiu-se de 481 árvores com DAP a partir de 10 cm, 810 plântulas descendentes de polinização aberta de 27 árvores maternas oriundas de 200 ha desta PEI e 88 regenerantes (DAP < 10 cm) oriundos da área total de estudo (500 ha). As árvores amostradas representam o total de árvores de *M. huberi* com DAP a partir de 10 cm dentro destes 200 hectares (Figura 2.2). A distribuição das árvores genotipadas e das árvores maternas na área amostrada está representada na Figura 2.2. Os tecidos vegetais utilizados para a extração de DNA foram do câmbio caulinar das árvores, e folhas das progênes e dos regenerantes. A coleta se deu por meio da retirada de uma pequena quantidade do caule com um instrumento metálico cilíndrico de 2,5 cm de diâmetro e 1 mm de espessura e as amostras colocadas em microtubos de 2ml contendo tampão de transporte para manter a integridade do DNA. No laboratório, os câmbios foram congelados a -40°C até o processamento das amostras para a extração de DNA. As folhas dos descendentes foram obtidas após germinação de sementes coletadas ao longo do período de dispersão de frutos da espécie. As sementes foram postas a germinar em viveiro de mudas da EMBRAPA Amazônia Oriental, em Belterra-PA. As folhas dos regenerantes foram coletadas diretamente dos indivíduos na floresta. Todas as folhas foram acondicionadas em sacos de papel, contendo sílica gel azul (8 mm) em câmara fria até a extração do DNA.

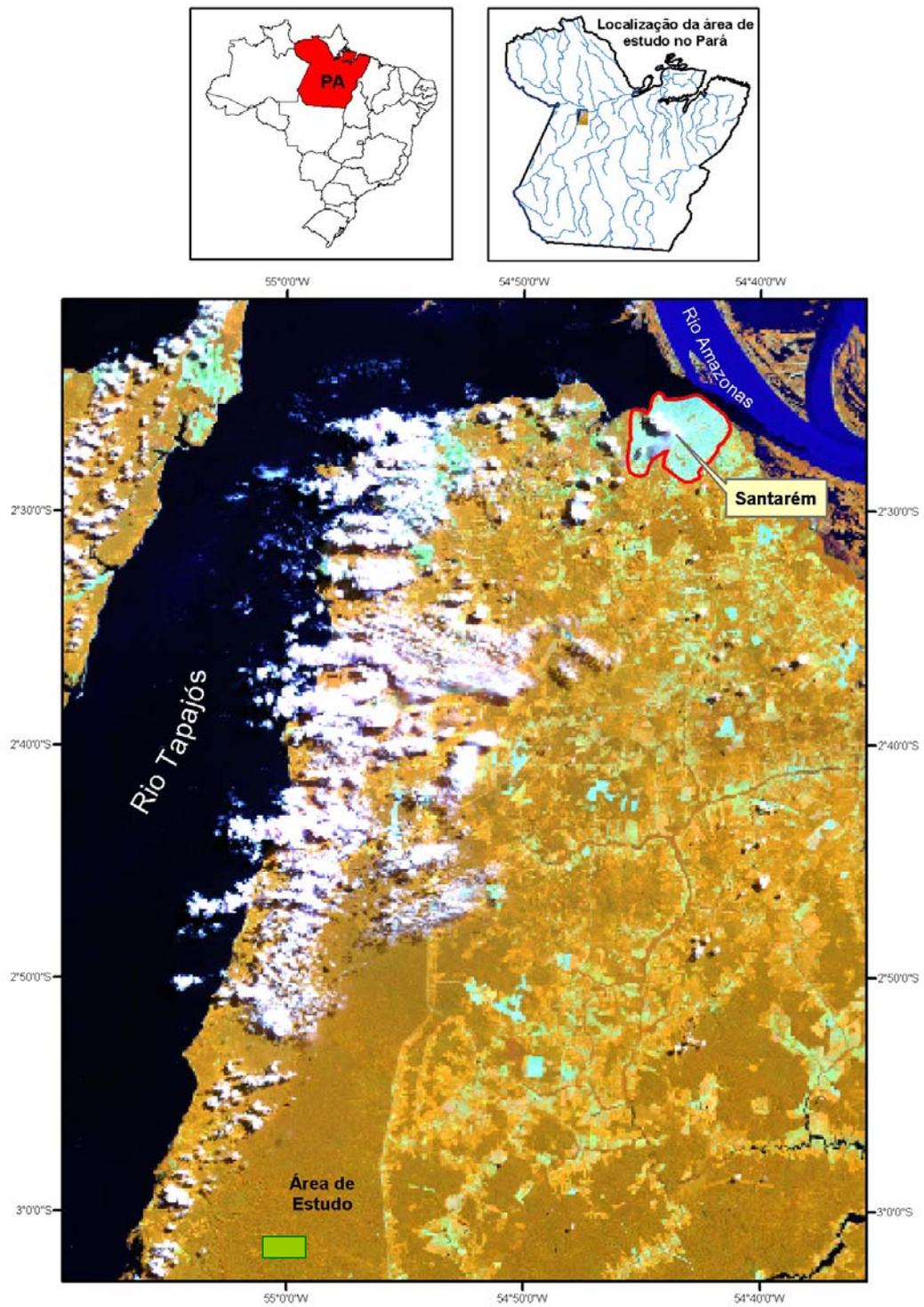


Figura 2.1: Localização da área estudada na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA Tapajós), Pará, Brasil. Fonte: Nasa, 2001.

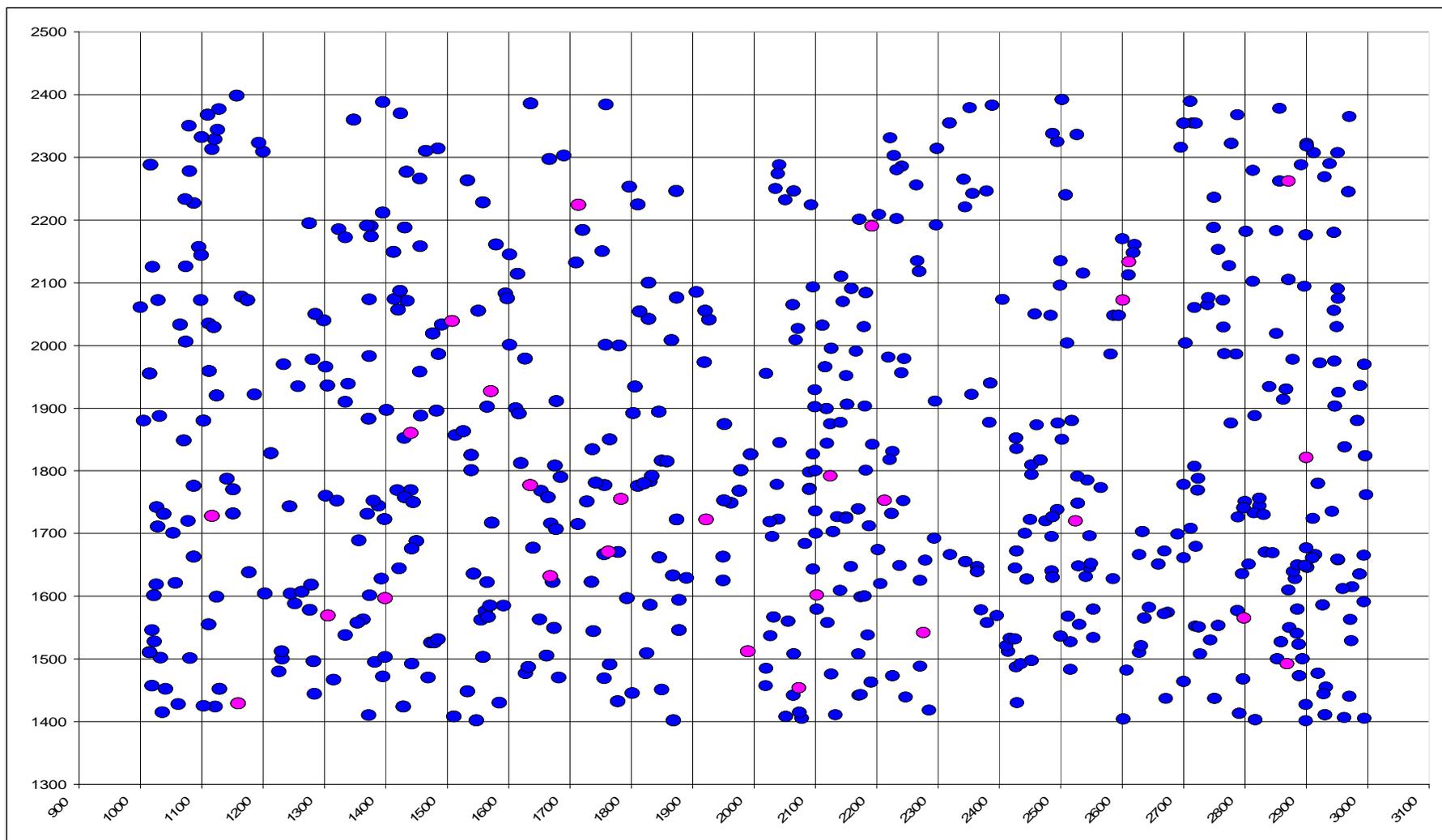


Figura 2.2. Mapa da área de 200 hectares estudada. Cada retícula representa 1 hectare. Os círculos azuis representam as árvores genotipadas, e os círculos rosa representam as árvores maternas a partir das quais as sementes foram coletadas.

Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA genômico e a genotipagem dos indivíduos foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF. Tanto a extração do DNA de câmbio quanto de folhas 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 macerar com nitrogênio líquido. A quantificação do DNA foi feita por comparação com DNA padrão (λ DNA) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O DNA foi diluído para 1,0ng/ μ l.

Sistema *primer tail* e otimização dos SSRs

A análise genética das três gerações da população natural estudada foi conduzida utilizando marcadores microssatélites desenvolvidos e otimizados para *M.a huberi*. Os locos SSR foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para seqüências dinucleotídicas de motivos poliAG/TC (Azevedo *et al.*, 2005). A técnica utilizada foi a de iniciadores *tail* de cerca de 40 pb (Missiaggia & Grattapaglia, 2006; Oetting *et al.*, 1995). Iniciador com cauda (*tail*) consiste de um dos iniciadores, em cada um dos locos avaliados, em cuja extremidade 5' foi acrescentada uma extensão ou “cauda” de oligonucleotídeos de 20 pb (*tail*) de seqüência não comum no genoma estudado. Neste caso foi utilizada uma seqüência igual à de um loco do cromossomo Y humano. Essa extensão é igual a um outro oligonucleotídeo marcado com fluorocromo, denominado iniciador marcado (Figura 2.3). Três tipos de extensões *tail* foram alternativamente utilizadas para a síntese dos iniciadores (*tail*). Da mesma forma, três tipos de marcações (HEX, NED e 6-FAM) foram feitas nos iniciadores marcados. Para a amplificação de cada loco foram utilizados o iniciador *forward tail*, o *reverse* e o marcado com o fluorocromo. Como o esse sistema envolve três iniciadores,

sendo um deles muito longo (40 pb), nova otimização quanto à temperatura de anelamento foi feita para onze locos marcados (Mh03, Mh04, Mh06, Mh07, Mh08, Mh12, Mh17, Mh19, Mh20, Mh22, Mh26). As reações eram de 13 µl de volume final, contendo 4 ng de DNA genômico, 1x de tampão de reação da PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 0,27 µM de cada iniciador (*forward tail*, *reverse* e marcado), 2,0 mM de MgCl₂, 0,25 mg/ml de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Biolabs New England), 0,25 mM de dNTP e 1,3U *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Life Technologies) e água ultrapura estéril. As amplificações foram realizadas utilizando termociclador 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: *hot start* a 94°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 45 seg, Ta °C por 45 seg (Tabela 2.1), e 72 °C por 1 min. Após os 35 ciclos, uma etapa final de alongamento de 30 min a 72°C foi acrescentada.

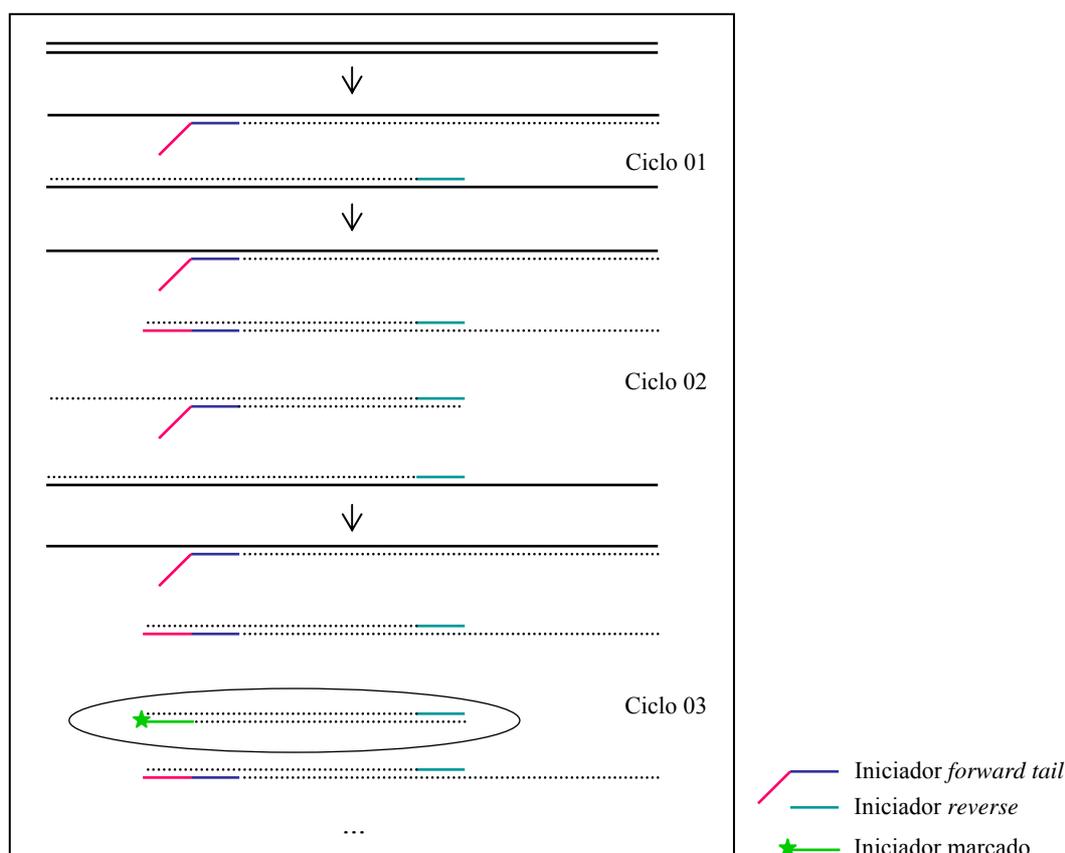


Figura 2.3. Esquema do sistema de iniciador *tail*. A partir do segundo ciclo da reação de PCR são gerados fragmentos que contém a seqüência complementar ao iniciador marcado e a partir do terceiro ciclo são gerados os fragmentos que contém a marcação e que vão ser detectados.

A decisão em relação à utilização do sistema *primer tail* foi tomada uma vez que o Projeto Dendrogene estudou simultaneamente sete espécies, e devido a isso, a marcação direta dos iniciadores específicos poderia tornar o sistema ainda mais caro. As reações de PCR foram realizadas separadas para cada loco e utilizando-se, quando possível, sistemas *multiplex* onde os produtos de cada loco foram analisados conjuntamente na eletroforese para detecção dos alelos por fluorescência, em analisador automático de fragmentos ABI 377 da Perkin Elmer (Figura 2.4). Quando foram montados sistemas do tipo *triplex*, amostras de 1 µl dos produtos de três locos SSR marcados com diferentes fluorocromos, ou com mesmo fluorocromo, porém com amplitudes alélicas distintas foram misturados junto com 2 µl de um *mix* contendo marcador interno (ROX) e tampão formamida (1:2). O marcador interno fluorescente utilizado foi o desenvolvido por Brondani & Grattapaglia (2001). Esta mistura foi desnaturada por 3 minutos a 95°C da qual 2 µl foram utilizados para eletroforese de 2 horas, conduzida em gel desnaturante (7M uréia) de poliacrilamida 5% (*Long Ranger 50%*-Cambrex) em tampão TBE 1x utilizando um pente de membrana para 96 amostras (Gel Company), cujos dentes absorvem a amostra.

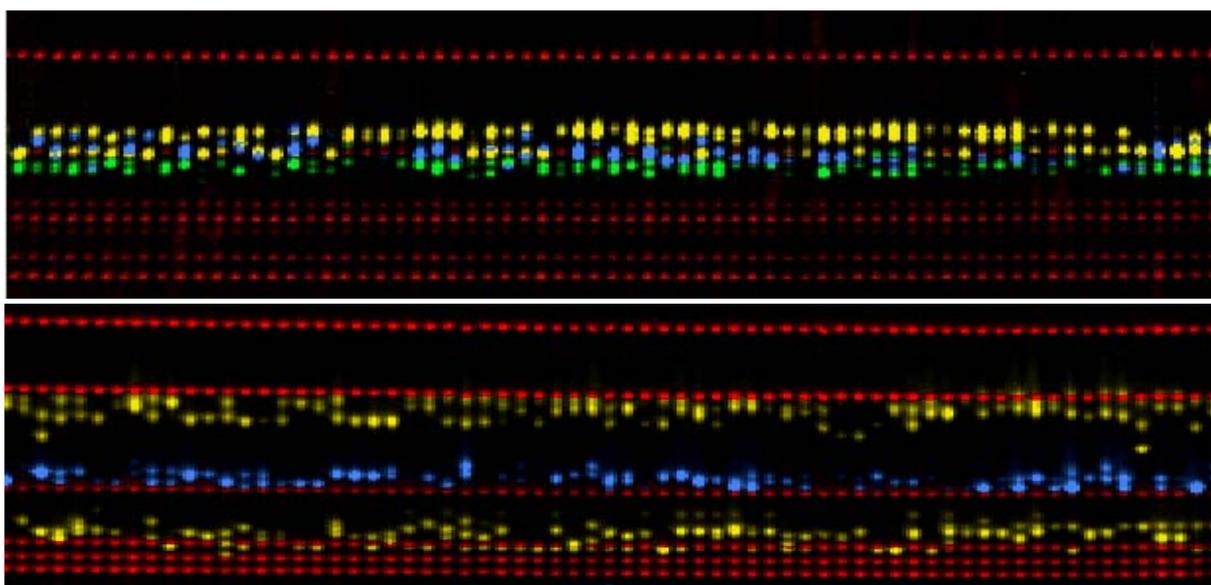


Figura 2.4. Exemplos de genotipagem de indivíduos adultos de *Manilkara huberi* utilizando o sistema *multiplex* com três locos distintos, em analisador automático de fragmentos ABI 377. As bandas vermelhas representam o marcador interno ROX.

A detecção e a estimativa do tamanho de alelos em pares de base foram realizadas com o uso do *software GeneScan* (Applied Biosystems versão 3.1.2). Em seguida os valores foram importados para o *software Genotyper* (Applied Biosystems versão 2.5.2) 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 na fase do desenho do iniciador após o seqüenciamento de clones 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.

Diversidade genética e índice de fixação

As estimativas de números de alelos/loco (A) e frequências alélicas foram calculadas diretamente dos genótipos obtidos para os indivíduos. As estimativas de heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e o índice de fixação (f) foram estimados segundo Weir (1996). Este índice f é o valor individualizado por população de F_{IS} e mede o desvio da proporção de heterozigotos do esperado segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) dentro da população, ou pode-se dizer que é o índice de fixação de alelos dentro da população. O valor deste índice varia entre -1 e +1, sendo zero o valor encontrado para uma população em EHW. Valores positivos indicam excesso de homozigotos (endogamia, efeito de Wahlund) e valores negativos um excesso de heterozigotos. A dimensão da diversidade genética foi quantificada pela comparação entre as estimativas de diversidade genética a qual é estimada pelo valor de H_e e a máxima diversidade possível em cada loco de acordo com o número total de alelos ($\hat{h}_{m\acute{a}x} = (\hat{A} - 1) / \hat{A}$). Como a amostra incluía três gerações (adultos, regenerantes e progênies), estas foram consideradas como sendo três

populações e também foram obtidos valores de F (F_{IT}) e θ_p (F_{ST}). Também foi testada a aderência das frequências genóticas ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg, usando o teste exato de Fisher. Os p-valores (*P value*) do teste de significância de desvio do esperado para uma situação de equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação, que estima se há associação entre alelos a locos distintos foram obtidos. A consistência das estimativas foi calculada pelo método de *bootstrap* utilizando 10000 reamostragens. Todas essas estimativas foram calculadas utilizando-se o *software* GDA - *Genetic Data Analysis* versão 1.0 (Lewis & Zaykin, 2001).

Como a população adulta estudada é composta por indivíduos cujos valores de DAP estão entre 10 cm e 140 cm e está distribuída numa área relativamente grande (200 ha), essa população foi dividida em grupos de acordo com o DAP para avaliar se há variações nos valores de diversidade genética e índice de fixação. Desse modo foram feitos dois tipos de divisão: 1) dois grupos: um com indivíduos apresentando DAP abaixo de 45cm (menor que o permitido para exploração) e outro grupo que representa as árvores comerciais, DAP a partir de 45cm. 2) Dez grupos também foram formados de acordo com os valores de DAP (10 a 20cm, 21-30cm, 31-40 cm, 41-50 cm, 51-60 cm, 61-70 cm, 71-80 cm, 81-90 cm, 91-100 cm, 101-140 cm).

Estrutura genética espacial

Para a análise de autocorrelação espacial da geração adulta utilizaram-se todos os oito locos que apresentaram amplificação eficiente nesta geração dentre os onze marcados com fluorescência. Por meio desta análise procurou-se verificar a presença e extensão da estrutura espacial dentro da população. Para isso, todos os possíveis pares de árvores foram considerados como um conjunto e foram acessados para cada uma das 10 classes de distâncias consideradas. Essas estimativas foram obtidas por meio dos cálculos dos valores do índice *I*

de Moran (Sokal & Oden, 1978) para cada uma das classes de distância, em cada loco e para a média dos locos. Os valores estimados do índice I de Moran foram usados para testar a significância dos desvios dos valores esperados sobre a hipótese nula de distribuição aleatória. A significância total do correlograma foi testada usando critérios de Bonferroni. As análises de autocorrelação espacial e os testes foram realizados utilizando-se o *software* SGS - *Spatial Genetic Software* (Degen *et al.*, 2001; Degen, 2003).

Os resultados obtidos foram confirmados utilizando o *software* SPAGeDi - *Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity*, versão 1.1 (Hardy & Vekemans, 2002, 2003) que permite, entre outros parâmetros, calcular o coeficiente de coancestria (θ_{xy}) entre pares de árvores. Este coeficiente de coancestria corresponde à 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 proposto por Loiselle *et al.* (1995), que é definido para cada k alelo em cada par de indivíduos, x e y , como,

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

em que, p_x e p_y são as frequências do alelo k nos indivíduos x e y (assumindo valores de 0, 0,5 e 1 em indivíduos homozigotos para um alelo alternativo, heterozigotos e homozigotos para o alelo sob consideração, respectivamente) e \bar{p}_k é a média da frequência do alelo k na subpopulação com tamanho amostral n . As estimativas da média multiloco foram calculadas pela ponderação de θ_{xy} em função do índice de polimorfismo de cada alelo k : $\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)$. O intervalo de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente médio de coancestria estimada para cada classe de distância foi construído com base no erro padrão da média das estimativas, obtido por reamostragem *jackknife* entre locos.

Análise de fluxo gênico

O fluxo gênico via pólen foi avaliado usando a estrutura de progênies por análises utilizando o *software* TWO-GENER (Austerlitz & Smouse, 2001; Smouse *et al.*, 2001). O princípio deste método é estimar a diferenciação nas frequências alélicas entre o conjunto de pólen cruzado (Φ_{ft}) entre diferentes árvores mães da população. O parâmetro Φ_{ft} é calculado por análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) como uma correlação intra-classe de gametas masculinos (pólen) dentro de árvores mães, em que, σ_a^2 é a variância na frequência do pólen entre árvores e σ_d^2 é a variância na frequência do pólen dentro de árvores.

$$\Phi_{ft} = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_a^2} \text{ (Smouse \& Sork, 2004),}$$

O parâmetro Φ_{ft} foi estimado sobre os haplótipos gaméticos do pólen capturados para a média das 27 árvores maternas avaliadas. Outros parâmetros estimados foram: o desvio padrão da dispersão de pólen (σ_p), a distância média do fluxo de pólen (δ), a densidade de árvores reprodutivas por hectare (d).

Sistema de cruzamento

O sistema de reprodução foi analisado com base nos modelos de reprodução mista (Ritland & Jain, 1981) e cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989), usando o *software* MLTR win – *Multilocus Mating System Program* (Ritland, 2002). Os parâmetros estimados foram: taxa populacional de cruzamento multiloco (t_m); taxa populacional de cruzamento uniloco (t_s); cruzamento biparental, ou seja, a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$); correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$), correlação uniloco de paternidade ($r_{p(s)}$), de onde deriva a proporção de irmãos-completos (r_p) e meios-irmãos (1-

\hat{r}_p). O modelo assume que as plântulas resultam de uma mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundação, cujas pressuposições básicas são: 1) o conjunto de pólen é homogêneo para os cruzamentos com todos os genótipos maternos; 2) os alelos de diferentes locos segregam independentemente e 3) os locos não são afetados pela seleção ou mutação entre o evento reprodutivo e a análise (Ritland & Jain, 1981). Para estimar o erro padrão da taxa de cruzamento multiloco e uniloco, para a população, foi utilizado o método de *bootstrap*, onde a unidade de amostragem eram as plântulas dentro das famílias, sendo utilizadas 1000 reamostragens. O tamanho de vizinhança, ou o número de doadores de pólen foi estimado por $1/\hat{r}_p$. Os desvios foram obtidos por 1000 bootstraps por família.

A fim de conhecer a estrutura genética das progênies, foi estimado o coeficiente médio de coancestria (θ_{xy}) entre plantas dentro de progênies. O coeficiente θ_{xy} foi estimado do coeficiente de correlação de parentesco (r_{xy}) dentro de progênies, calculado de parâmetros do sistema de reprodução, conforme derivações de Ritland (1989),

$$\hat{r}_{xy} = 0,25(1 + \hat{F})[4\hat{s} + (\hat{t}^2 + \hat{r}_s\hat{t}\hat{s})(1 + \hat{r}_p)],$$

e F o coeficiente de endogamia na geração parental e \hat{s} a taxa de autofecundação ($1 - \hat{t}_m$). A definição dos demais parâmetros é a mesma apresentada anteriormente. Como em espécies diplóides, na ausência de endogamia, o coeficiente de parentesco (r_{xy}) é o dobro do coeficiente de coancestria (θ_{xy}), tem-se que $\hat{\theta}_{xy} = \hat{r}_{xy} / 2$. Para conhecer a representatividade genética das progênies foi estimado o tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) de uma progênie com base na variância amostral das frequências alélicas (Cockerham, 1969) e utilizando uma população idealizada (população de cruzamentos aleatórios, tamanho infinito, sem seleção, mutação e sobreposição de gerações) como referência, cujo valor teórico máximo é quatro (Sebbenn, 2003),

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0,5}{\hat{\theta}_{.xy} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1 + \hat{F}_p}{2n}} .$$

sendo o F_p o coeficiente de endogamia nas progênies. A partir do tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$), foi estimado o número necessário de árvores maternas, das quais devem ser coletadas sementes para que seja mantido o tamanho efetivo ($N_{e(ref)}$) igual a 500, sendo este o resultado da divisão $\hat{N}_{e(ref)} / \hat{N}_{e(v)}$ conforme apresentado por Sebbenn (2003).

RESULTADOS

Otimização da reação de PCR

Dentre os catorze locos polimórficos desenvolvidos, doze foram marcados com fluorescência e testados em reações de PCR do tipo que utiliza iniciadores *tail*. Destes doze, apenas um, Mh12, não amplificou. Oito amplificaram de forma eficiente para a população de árvores adultas e regenerantes e sete para os descendentes e a temperatura de anelamento (T_a) variou de 51 a 53°C (Tabela 2.1). Os demais não amplificaram fragmentos nítidos e não foram utilizados. Em virtude do iniciador mais longo e da maior amostragem analisada em relação ao desenvolvimento dos iniciadores, a amplitude alélica também variou e está representada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Locos utilizados nas genotipagens das três gerações de *Manilkara huberi*.

Locos	<i>n</i>	<i>A</i>	T_a (°C)	Marcação	Cor	Amplitude alélica (pb)
Mh04	1362	14	51	6-FAM	Azul	197-225
Mh06	1354	19	53	HEX	Verde	176-216
Mh08	1376	17	53	NED	Amarelo	194-226
Mh17	1355	19	53	NED	Amarelo	236-280
Mh19	1327	18	53	6-FAM	Azul	168-202
Mh20	1349	21	53	NED	Amarelo	152-192
Mh22	1347	11	53	NED	Amarelo	194-220
Mh26	556	15	54	HEX	Verde	234-264

Nº. de ind.: número total de indivíduos genotipados, *A* : número total de alelos, T_a (°C): temperatura de anelamento. Fluorocromo utilizado na marcação. Cor: cada fluorocromo de acordo com o filtro D.

Frequências alélicas

O número de alelos por locos (*A*) na geração dos adultos variou de 11 (Mh22) a 20 (Mh20) com média igual a 16,13 somando um total de 129 alelos nessa geração para oito locos analisados. Para os regenerantes, a média estimada de alelos por loco foi de 12,00 com um total de 96 alelos em oito locos. Na geração dos descendentes o índice *A* variou de 11

(Mh22) a 19 (Mh17), com média igual a 15,57, somando 109 alelos em sete locos. Observa-se que a geração de regenerantes apresenta menor média de alelos por loco que as outras gerações o que pode ser devido à amostragem consideravelmente menor. As gerações de adultos e descendentes apresentaram alelos exclusivos, os quais são alelos raros e estão apresentados na Tabela 2.2. A distribuição das freqüências alélicas está listada nas figuras 2.5, 2.6 e 2.7.

Se considerarmos que, conforme descrito na literatura, alelo raro é todo alelo cuja freqüência é inferior a 5%, na geração de árvores adultas foram identificados 72 alelos raros de um total de 129 alelos, os regenerantes apresentaram 46 alelos raros entre 96 identificados, e os descendentes 64 alelos raros de um total de 109 alelos. Considerando que cada geração apresenta em média entre 12,00 e 16,13 alelos por loco, caso os alelos fossem equifreqüentes, a freqüência de cada seria entre torno de 8,3 e 6,2% e todos teriam freqüências próximas à de alelos raros de modo que havendo alelos com maiores freqüências todos os demais seriam considerados raros. Como locos com alelos equifreqüentes não são observados com freqüência, e locos SSR costumam apresentar alta quantidade de alelos, é de se esperar que quanto maior a amostragem, maior a quantidade de alelos raros identificados. De modo geral, comparando-se a freqüência dos alelos comuns, entre as três gerações verifica-se semelhança.

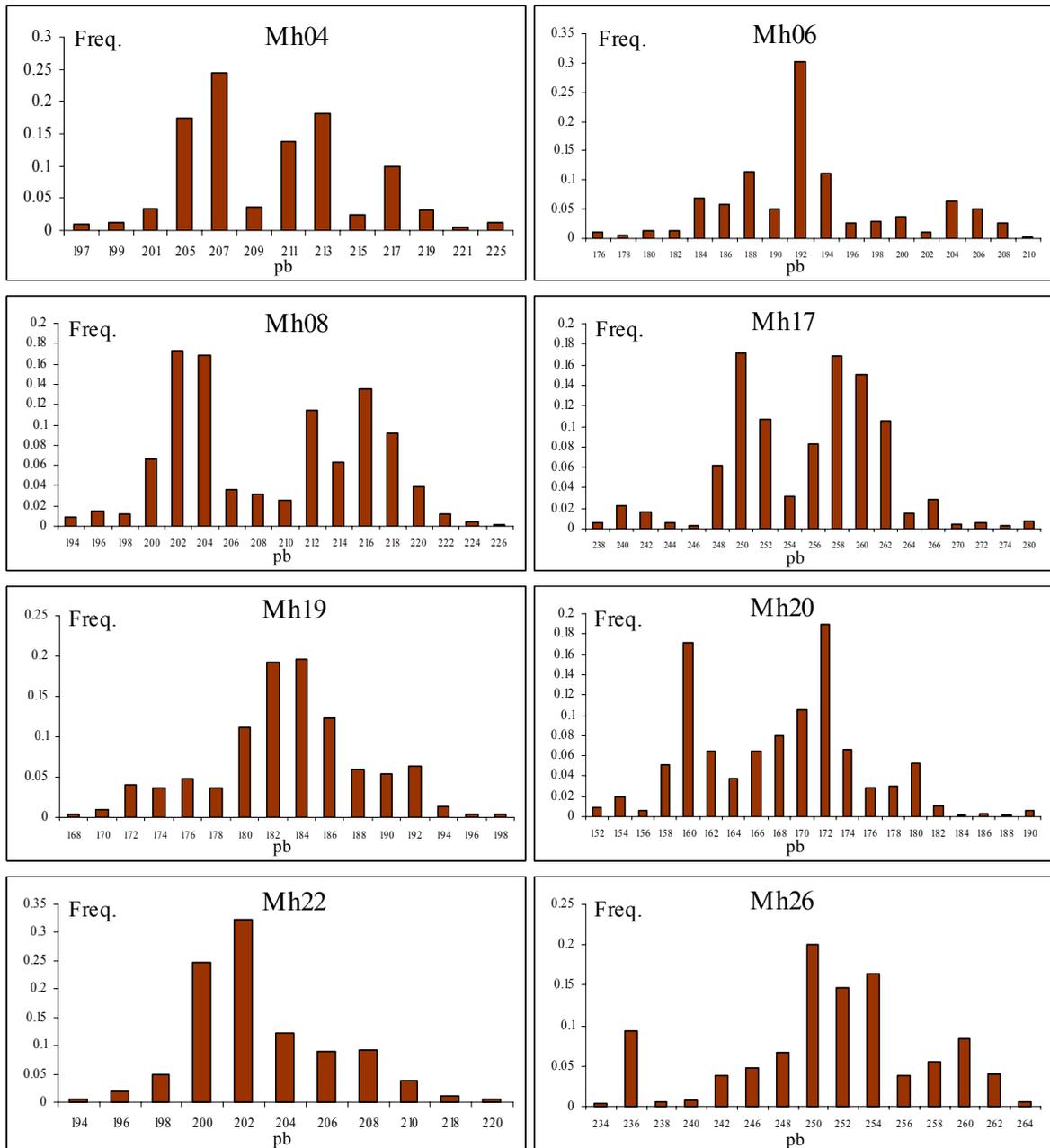


Figura 2.5. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população adulta.

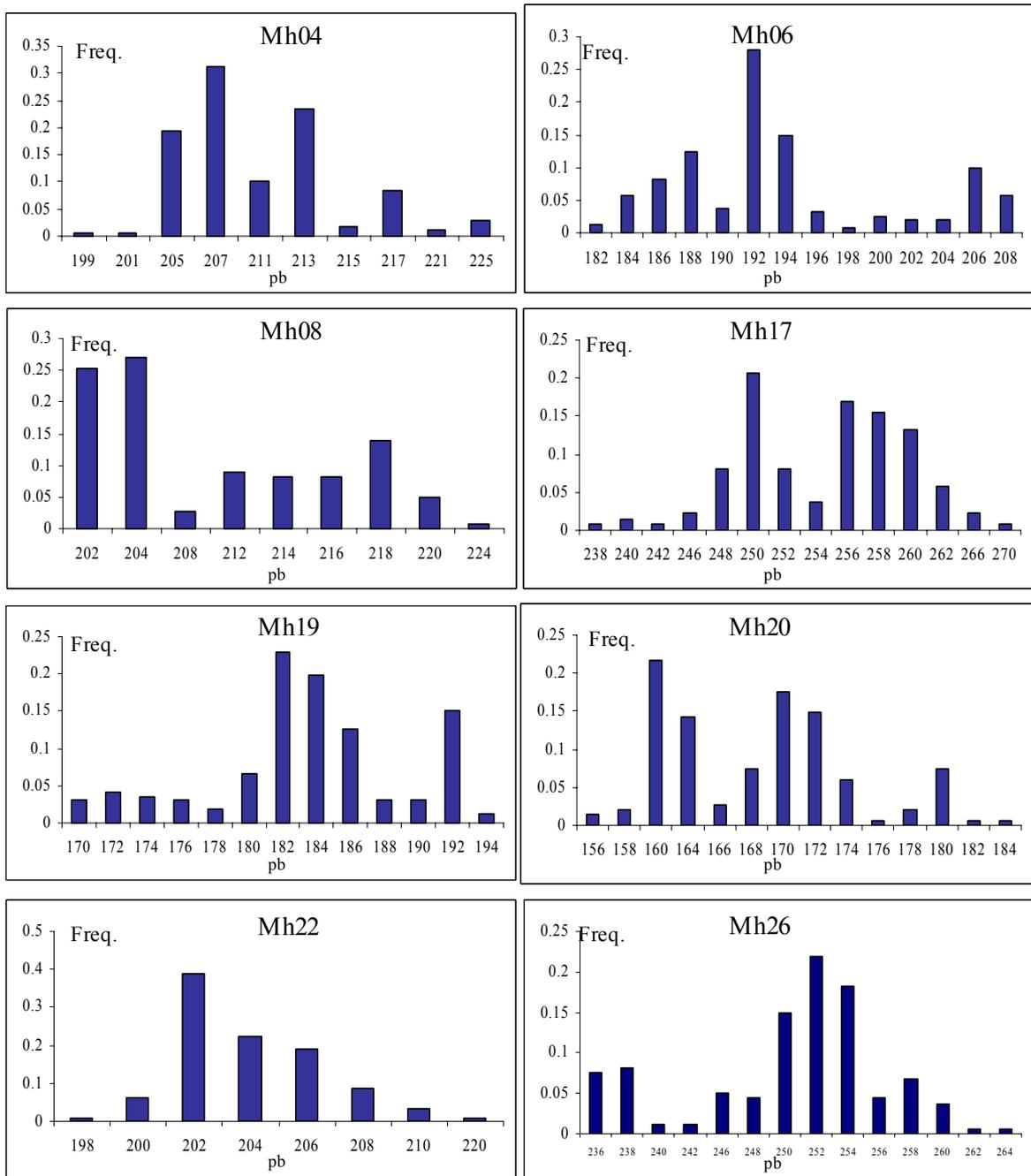


Figura 2.6. Distribuição das frequências alélicas dos oito locos analisados na população regenerante.

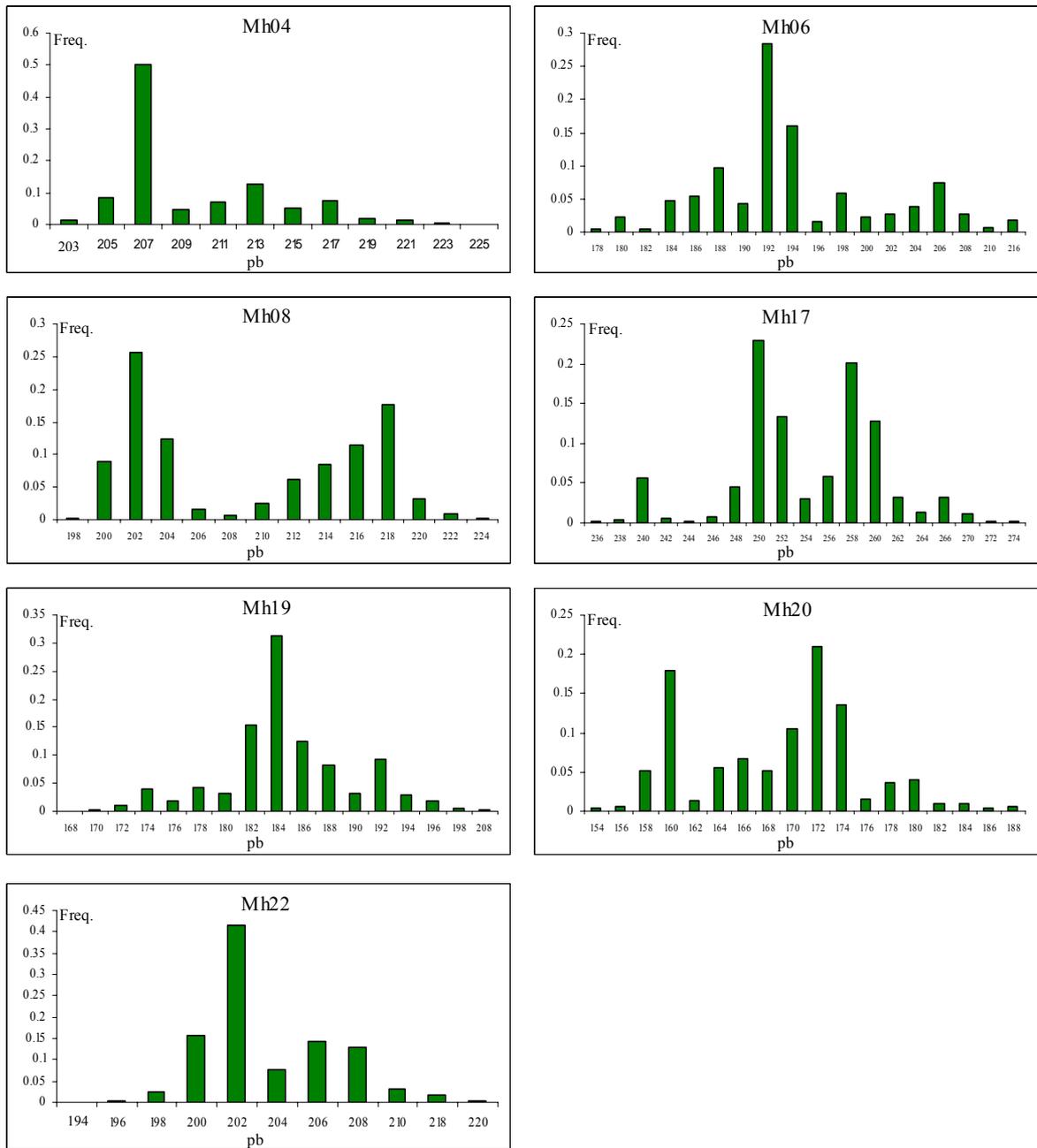


Figura 2.7. Distribuição das frequências alélicas da geração dos 810 descendentes de 27 árvores maternas da população adulta de *M. huberi*.

Tabela 2.2. Alelos raros exclusivos a cada geração e suas frequências.

Loco	A (pb)	Freq.	Loco	A (pb)	Freq.
<i>Adultos</i>			<i>Descendentes</i>		
Mh08	194	0,008	Mh04	223	0,007
	196	0,015	Mh06	216	0,018
			Mh17	236	0,002
			Mh19	208	0,002

A (pb) diz respeito ao alelo em tamanho de pares de base.

Diversidade genética e índice de fixação

Os valores de heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) e índice de fixação (f) foram altos em quase todos os locos nas três gerações: adultos, regenerantes e descendentes. Para as árvores adultas, a heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,800 (Mh19) a 0,896 (Mh20) com média igual a 0,867; a heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,602 (Mh22) a 0,782 (Mh04) com média igual a 0,679 e o índice de fixação (f) médio igual a 0,221 (Tabela 2.3). Para os regenerantes o índice H_e médio foi de 0,840 e o H_o foi de 0,594, com índice de fixação médio igual a 0,303. Na geração dos descendentes; o H_e variou de 0,706 (Mh04) a 0,858 (Mh20) com média igual a 0,811; o H_o de 0,468 (Mh19) a 0,768 (Mh17) com média igual a 0,622 e o f variou de 0,109 (Mh08) a 0,432 (Mh19), com média igual a 0,237 (Tabela 2.3). Em ambas as gerações a diversidade genética de Nei (1973) (H_e) foi elevada e semelhante entre os locos das três gerações, sendo que em todos os casos a média atingida foi maior que 86% da máxima possível. Flutuações foram identificadas principalmente nos valores de H_o sendo o loco Mh22 o com menor valor para adultos e regenerantes (Tabela 2.3). O índice de fixação médio dentro de populações (f) apresentou valores positivos altos e consistentes de acordo com o teste de *bootstrap* para a média dos locos em todas as gerações (Tabela 2.3). O índice f não foi significativamente diferente

entre as gerações, a julgar pelo intervalo do teste de *bootstrap*. O índice de fixação para o conjunto das populações (F ou F_{IT}) apresentou, em nível de loco valores semelhantes aos obtidos para f indicando poucas diferenças genéticas entre as gerações. Os valores de f consistentes indicam excesso de indivíduos homozigotos em todas as gerações e sugerem desvios do EHW e, portanto, desvio também de cruzamentos aleatórios. A medida de divergência genética entre as gerações (θ_p ou F_{ST}) foi baixa em todos os locos, bem como para a média (0,018). Entretanto, apesar de baixa, foi consistente para a média dos locos, em todas as comparações, i.e., adultos-regenerantes-descendentes; adultos-regenerantes; adultos-descendentes e regenerantes-descendentes, portanto, não podendo ser negligenciada (Tabela 2.5).

Nos testes nos quais os indivíduos da geração adulta foram agrupados de acordo com as classes diamétricas, pouca variação para os parâmetros calculados foi observada. As classes de 21-30 cm e 71-80 cm de DAP apresentaram os valores de f mais altos (0,281 e 0,254) e a classe de 101-140 cm apresentou o menor valor de f (0,108). Os valores médios de f e F foram positivos e significativos, indicando excesso de homozigotos dentro das classes e para o total das classes. A estimativa de divergência genética entre as populações (θ_p) em ambos os casos foi baixa e não consistente, portanto, não significativamente diferente de zero, indicando não haver diferença entre as classes diamétricas (Tabela 2.4).

Tabela 2.3. Estimativas obtidas da análise das três gerações de *Manilkara huberi* em cada loco.

Locos	<i>Adultos (DAP > 10cm)</i>							<i>Regenerantes (DAP < 10cm)</i>						<i>Descendentes (sementes)</i>							
	<i>n</i>	<i>A</i>	<i>H_e</i>	<i>h_{máx}</i>	$\hat{H}_e/h_{máx}$ (%)	<i>H_o</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>H_e</i>	<i>h_{máx}</i>	$\hat{H}_e/h_{máx}$ (%)	<i>H_o</i>	<i>f</i>	<i>n</i>	<i>A</i>	<i>H_e</i>	<i>h_{máx}</i>	$\hat{H}_e/h_{máx}$ (%)	<i>H_o</i>	<i>f</i>
Mh04	481	13	0,845	0,923	91,6	0,782	0,074	88	10	0,796	0,900	88,4	0,704	0,116	799	12	0,706	0,917	77,1	0,553	0,203
Mh06	414	18	0,862	0,944	91,3	0,693	0,196	80	14	0,861	0,928	92,8	0,612	0,290	777	18	0,856	0,944	91,1	0,631	0,265
Mh08	480	17	0,889	0,941	94,4	0,712	0,199	61	09	0,825	0,888	92,9	0,590	0,286	804	14	0,858	0,928	92,4	0,767	0,112
Mh17	449	19	0,884	0,947	93,3	0,654	0,259	68	14	0,874	0,928	94,2	0,511	0,431	778	19	0,832	0,947	87,8	0,744	0,109
Mh19	481	16	0,880	0,938	93,8	0,677	0,243	83	13	0,863	0,923	93,5	0,771	0,107	802	17	0,820	0,941	87,1	0,468	0,432
Mh20	465	20	0,896	0,950	94,3	0,632	0,294	74	14	0,869	0,928	93,6	0,527	0,395	754	18	0,847	0,944	89,7	0,657	0,209
Mh22	474	11	0,800	0,910	88,0	0,602	0,272	63	08	0,756	0,875	86,4	0,485	0,424	805	11	0,749	0,910	82,3	0,531	0,328
Mh26	473	15	0,882	0,933	94,5	0,686	0,236	80	14	0,877	0,928	94,5	0,550	0,374	-	-	-	-	-	-	-
Média	464,75	16,13	0,867	0,936	92,6	0,679	0,221	74,62	12,00	0,840	0,912	92,0	0,594	0,303	788,43	15,57	0,811	0,933	86,8	0,622	0,237
Superior							0,309							0,423							0,333
Inferior							0,172							0,224							0,160

n, número de indivíduos analisados; *A*, número de alelos; *H_e*, heterozigosidade esperada; *h_{máx}*, diversidade genética máxima possível; $\hat{H}_e/h_{máx}$, proporção da diversidade genética máxima possível; *H_o*, heterozigosidade observada e *f*, índice de fixação de alelos. Os valores Superior e Inferior representam o intervalo obtido com o teste de reamostragens do *bootstrap* (IC 99%).

Tabela 2.4. Estimativas obtidas para os grupos de *Manilkara huberi* separados de acordo com as classes diamétricas.

Grupo	n	A	H_e	H_o	$f (F_{IS})$	$F (F_{IT})$	$\theta_p (F_{ST})$
1. Comerciais e não comerciais							
DAP < 45cm	119	15,14	0,850	0,667	0,215		
DAP > 45cm	154	16,14	0,855	0,658	0,230		
Média	136,5	15,64	0,852	0,703	0,223	0,225	0,001
Superior					0,222	0,262	0,003
Inferior					0,125	0,128	-0,001
2. Classes de DAP							
10-20cm	31	12,00	0,861	0,664	0,228		
21-30cm	39	12,57	0,851	0,612	0,281		
31-40cm	36	12,00	0,836	0,705	0,157		
41-50cm	25	11,14	0,845	0,701	0,170		
51-60cm	28	10,71	0,842	0,674	0,199		
61-70cm	32	12,14	0,867	0,678	0,218		
71-80cm	25	10,71	0,838	0,625	0,254		
81-90cm	17	10,00	0,854	0,677	0,219		
91-100cm	19	9,57	0,853	0,667	0,218		
101-140cm	21	10,71	0,853	0,761	0,108		
Média	26,8	11,16	0,850	0,668	0,219	0,220	0,001
Superior					0,272	0,287	0,003
Inferior					0,125	0,127	-0,001

n , número de indivíduos analisados; \hat{A}_p , número médio de alelos polimórficos por classe; \hat{H}_e , heterozigosidade esperada; \hat{H}_o , heterozigosidade observada e \hat{f} , índice de fixação de alelos. Valores Superior e Inferior representam o intervalo obtido com o teste de reamostragens do *bootstrap* 95%.

Tabela 2.5. Resultados obtidos das comparações entre as gerações de *M. huberi* analisadas par a par. Valores de θ_p .

	Adultos	Regenerantes
Adultos	-	
Regenerantes	0,021	-
Descendentes (sementes)	0,018	0,017

Valores médios de divergência genética entre as gerações (θ_p).

Desequilíbrio de HW e desequilíbrio de ligação

O teste exato de Fisher detectou desvios na aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os locos, conforme já havia sido observado para o índice f , que indicou excesso de homozigotos em todos os locos. Foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação de Burrows. Tendo em vista que os testes de desequilíbrio de ligação são altamente sensíveis, optou-se por considerar ligações significativas entre locos quando a probabilidade de rejeitar a hipótese nula era menor do que 95% e ocorriam em todas as gerações avaliadas, árvores

adultas e suas progênes e regenerantes. Foi detectado na geração de adultos desequilíbrio de ligação entre os pares de locos Mh08/Mh09 ($P=0,028$) e Mh20/Mh22 ($P=0,045$).

Estrutura genética espacial

O gráfico de correlação genética espacial, obtido por meio de cálculos do Índice I de Moran evidenciou estruturação genética espacial para a espécie (Figura 2.8), onde verificou-se que as árvores localizadas a uma distância de até 450 metros apresentam valores positivos e significativos para o referido índice, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% do teste de reamostragem. Houve uma contínua diminuição da autocorrelação, apresentando valores próximos a zero entre 450 e 900 metros até que, a partir de 900 metros apresenta valores negativos significativos, sugerindo que árvores próximas sejam parentes entre si e as árvores mais distantes sejam geneticamente não relacionadas, num claro padrão de isolamento por distância.

Esse resultado foi semelhante ao obtido utilizando o *software* SPAGeDi que calcula o coeficiente de coancestria com base em Loiselle *et al.* (1995) (Figura 2.9). Da mesma forma esta análise indicou valores positivos significativos até 400 metros e negativos significativos a partir de cerca de 1500 metros, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% dos testes de reamostragem.

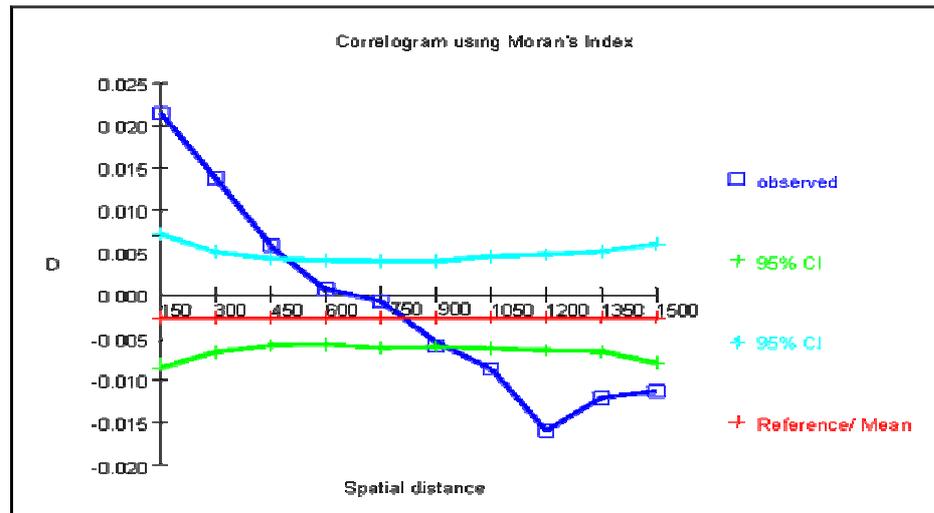


Figura 2.8. Correlograma do índice I de Moran para 10 classes de distância na população natural de *M. huberi*.

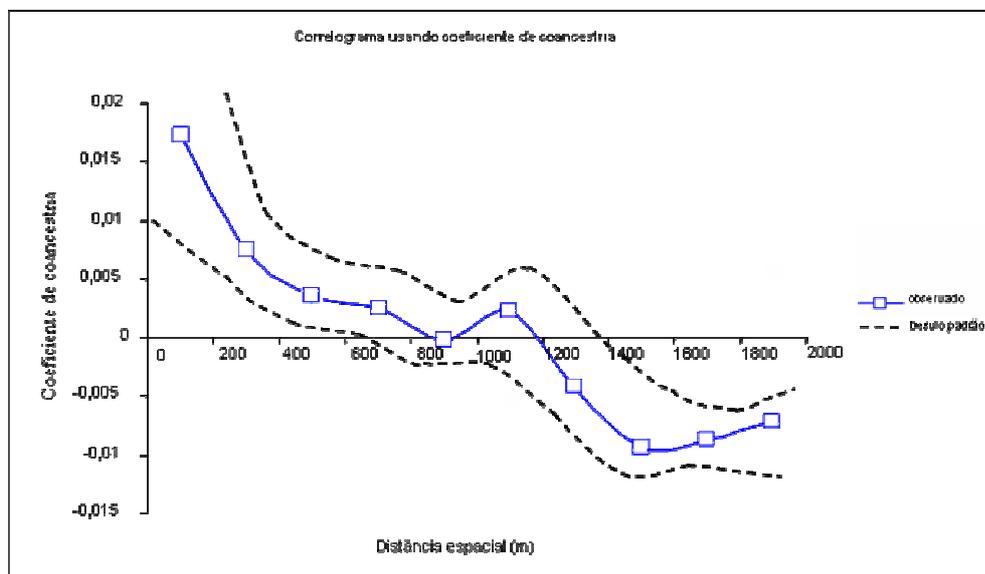


Figura 2.9. Representação gráfica do coeficiente de coancestria de acordo com Loiselle *et al.*, 1995 para 10 classes de distância na população natural de *M. huberi*.

A representação gráfica do coeficiente de coancestria e da distância espacial entre os genótipos de *M. huberi* evidenciou estrutura genética espacial significativa de acordo com os valores de desvio padrão a 95% de probabilidade, na distância de aproximadamente até 450 m, sugerindo dispersão de sementes restrita a esse espaço. O maior coeficiente de coancestria foi estimado na classe de distância de zero a 200 m ($\hat{\theta}_{xy}=0,018$; $P<0,05$), no entanto encontra-se abaixo do esperado em primos de segundo grau (Figura 2.9).

Análise de fluxo gênico

A distância média de fluxo de pólen (fluxo gênico) (δ) estimado por análise com o *software* Two-Gener foi de 49,5 metros com desvio padrão da dispersão de pólen de 0,69 m, indicando que a dispersão de pólen da espécie nessa área de floresta natural é restrita. A estimativa da distância média entre as mães (\bar{D}) foi de 739 metros e a densidade de árvores reprodutivas por hectare (d) foi igual a 1,9. O Φ_{ft} global que mede a divergência genética do pólen cruzado entre matrizes foi de 0,138.

Sistema de cruzamento

A estimativa da taxa de cruzamento multiloco (t_m) foi alta ($0,995 \pm 0,003$), indicando que a espécie é preferencialmente alógama. A diferença entre a estatística t_m e a unidade pode ser atribuída à endogamia biparental efetiva ou autofecundação ($1 - \hat{t}_m$). A taxa de cruzamento uniloco que diz respeito ao cruzamento entre indivíduos não aparentados (t_s), por sua vez, foi menor ($0,718 \pm 0,012$) e significativamente diferente da multiloco, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade, no entanto muito alta. A diferença entre a taxa de cruzamento multiloco e uniloco ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) tem sido interpretada como indicativo da ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados e para a espécie *M. huberi* esse valor foi de 0,282 ($\pm 0,012$). A julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade, obtido para a diferença ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), a estimativa da taxa de cruzamentos entre parentes é estatisticamente significativa.

A estimativa da correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$) detectou que 18,9% das progênies foram geradas por cruzamentos biparentais e são parentes no grau de irmãos-completos e 81,1% meios-irmãos. A estimativa da correlação uniloco de paternidade ($r_{p(s)} = 0,197$ ou 19,7%) foi pouco superior à multiloco, mas não significativamente diferente.

O cálculo do tamanho de vizinhança indicou que em média o número de árvores doadoras de pólen por matriz é igual a 5,9. A estimativa do coeficiente de coancestria entre plantas dentro de progênies (θ_{xy}) foi de 0,175, estando este entre o esperado para progênies de meios-irmãos (0,125) e irmãos completos (0,25).

O tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) médio de uma simples progênie foi de 2,66. Baseado neste resultado foi calculado o número mínimo de árvores maternas que devem ser consideradas na coleta de sementes para conservação *ex situ*. Objetivando a manutenção da diversidade genética a longo prazo, devem ser coletadas sementes de pelo menos 188 árvores maternas, mantendo-se assim o tamanho efetivo de 500.

DISCUSSÃO

Populações naturais de várias espécies nativas arbóreas vêm sendo avaliadas do ponto de vista genético com a utilização dos marcadores microssatélites, em sistemas *multiplex*, permitindo a genotipagem de forma rápida e eficiente. A técnica de *primer tail* apesar de aparentemente vantajosa no sentido de permitir utilizar o iniciador marcado em estudos com diferentes espécies, sendo, portanto, mais econômica, não se mostrou vantajosa, uma vez que a amplificação de fragmentos nítidos e de fácil interpretação fica prejudicada. Isso faz com que a otimização torne-se extremamente laboriosa. O conhecimento da distribuição da diversidade genética da espécie *M. huberi* é essencial para a adoção de estratégias eficientes para a conservação de seu germoplasma em condições *ex situ* e *in situ* e para a definição de um programa de manejo que seja sustentável para a espécie. Os marcadores SSR constituem uma poderosa ferramenta para estudos desta natureza.

Estudos da estrutura genética nos estratos de regenerantes (plântulas e juvenis) de uma mesma população, bem como a determinação precisa de parentesco entre regenerantes e adultos permite entender a dinâmica da manutenção da variabilidade entre gerações e, possivelmente, resultar em recomendações futuras sobre o manejo da regeneração (Ciampi *et al.*, 2000).

Diversidade genética e índice de fixação

Em relação à diversidade genética observou-se neste trabalho alto nível de multialelismo em todos os locos polimórficos. O número médio de alelos por loco foi elevado considerando o total de indivíduos. A presença de alelos observados nos descendentes e não nos adultos é devido a pólen vindo de fora da área amostrada. Alelos presentes nos adultos e

não nos descendentes implica em sucesso reprodutivo diferenciado ou efeito de amostragem de descendentes.

A heterozigosidade média esperada foi alta e a observada foi significativamente menor, indicando alta diversidade genética e taxa relativamente alta de endogamia na população estudada, visualizada pelo alto valor de f nas três gerações e em todas as classes diamétricas. Apesar de outros estudos de espécies arbóreas indicarem possível seleção contra homozigotos ao se comparar diferentes gerações (e.g., Sebbenn *et al.*, 2000b; Ribas & Kageyama, 2004) este padrão foi observado em *M. huberi*, mas não foi significativo. Alelos nulos podem ser uma das causas prováveis dos desvios de heterozigosidade esperada de acordo com EHW. A ocorrência de alelos nulos leva ao aumento da homozigose e redução da heterozigose, visto que indivíduos heterozigotos para o alelo nulo serão interpretados como homozigotos. Entretanto, presença de alelos nulos não deve ser a explicação mais provável para o alto valor de endogamia da espécie. Valores altos de f observados em todos os locos favorecem a interpretação de que a espécie seja realmente endogâmica e não que tenha havido super-estimação devido à presença de alelos nulos.

A ausência de desequilíbrio de ligação entre a maioria dos locos permitiu a obtenção de um conjunto de locos não ligados e que apresentavam níveis altos de diversidade genética, quando medida em termos de heterozigosidade esperada, equivalente à diversidade genética de Nei (1973).

Altos níveis de heterozigosidade eram esperados em *M. huberi*, visto que a espécie tem vida longa, ampla distribuição geográfica na floresta Amazônica e alta taxa de regeneração. Tais características favorecem a entrada de novos alelos por mutação e a recombinação dos alelos da população a cada geração, ou um grande número de combinações genotípicas. Esses fatores podem levar ao aumento do potencial evolutivo de espécies, pela maior capacidade de adaptação às possíveis mudanças ambientais.

Estrutura genética espacial

O estabelecimento de programas de amostragem em larga escala para acessar a diversidade genética e conseqüentemente permitir uma visão acurada da estrutura genética é, usualmente, o fator limitante quando o objetivo é aplicar técnicas de autocorrelação espacial (Diniz-Filho & Telles, 2001). Alguns estudos têm concluído que análises de autocorrelação espacial não devem ser realizadas com menos de 20 ou 30 indivíduos (Sokal & Jaquez, 1991). No caso de *M. huberi* os padrões espaciais detectados são claros, uma vez que a amostragem foi grande o suficiente para permitir que a autocorrelação espacial detectasse estruturação genética de forma significativa. As análises foram conduzidas com 481 indivíduos numa área de 200 ha utilizando duas técnicas de autocorrelação, a média do índice I de Moran e o coeficiente de coancestria de Loiselle *et al.* (1995), e ambos indicaram resultados semelhantes. A aplicação de análises de autocorrelação espacial para definir unidades de conservação é útil a partir do momento em que é possível definir os padrões de variação genética no espaço (Diniz-Filho & Telles, 2001) o que pode ser realizado com a finalidade de preservar grande parte da variação genética existente.

A dispersão de sementes a curtas distâncias tem sido observada em outras espécies tropicais cujos dispersores são pequenos animais, como o caso da *Carapa guianensis* (182 m) e da *Vouacapoua americana* (176 m) e até mesmo em espécies cujos dispersores são morcegos, pássaros e mamíferos arbóreos como a *Symphonia globulifera* (141 m) (Hardy *et al.*, 2006). Em relação às árvores tropicais, Boshier *et al.* (1995) relatam que para *Cordia alliodora* vizinhos próximos apresentam alta relação genética entre si em comparação com árvores mais distantes. Hamrick *et al.* (1993) demonstraram a presença de estrutura genética espacial em classes intermediárias de DAP em *Platypodium elegans*, *Alseis blackiana* e *Swartzia simplex* no Panamá.

Sistema de cruzamento

Os resultados obtidos indicam que se trata de uma espécie que se produz preferencialmente por cruzamento, de acordo a taxa de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m = 0,995 \pm 0,003$). Apesar das elevadas taxas de cruzamento detectadas nas populações, o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou desvio de cruzamentos aleatórios, que pode ter sido causado por cruzamento entre aparentados. Devido à estrutura floral da espécie, a autofecundação da mesma flor é inviável, uma vez que fase masculina e fase feminina ocorrem em diferentes intervalos, no entanto a autofecundação pode ter ocorrido entre diferentes flores da mesma árvore. Era esperado que fosse encontrado resultado indicando presença de autofecundação em baixo nível, uma vez que espécies hermafroditas apesar de apresentarem sistemas de auto-incompatibilidade que evitam a autofecundação, estes geralmente conseguem apenas mantê-la em níveis baixos. Murawski (1995) mostrou que 90,9% das espécies arbóreas tropicais que ocorrem no estrato superior do dossel, 75% das que ocorrem no estrato intermediário e 34% das espécies de sub-bosque apresentam algum mecanismo de auto-incompatibilidade. Apesar deste resultado de baixa autofecundação, a taxa de cruzamento entre parentes é elevada (28%). Isso pode estar ocorrendo devido à estruturação genética espacial aliada à alta densidade da espécie na floresta primária e devido à floração sincrônica, que gera uma densa oferta de flores à curta distância.

Em *M. huberi* a detecção de alta taxa de cruzamentos entre parentes sugere que a população apresenta alguma estrutura genética interna. De fato foi detectado que a dispersão de sementes deve ser restrita, atingindo até 450 metros, estando os indivíduos parentes localizados neste raio de distância. Valores de coancestria positiva foram observados variando próximos somente ao nível de primos de segundo grau (0,0325). Cruzamentos entre indivíduos parentes têm sido detectados em diversos outros estudos do sistema de reprodução,

em populações naturais de espécies arbóreas tropicais (Sebbenn *et al.* 2000b; Collevatti *et al.* 2001; Souza *et al.*, 2003).

Comparado à autofecundação, o cruzamento entre parentes gera menos endogamia, e.g., a autofecundação aumenta a endogamia em 50% a cada geração, enquanto que o cruzamento entre indivíduos meios-irmãos gera endogamia de 12,5% e o cruzamento de irmãos-completos gera endogamia de 25%. Se os cruzamentos ocorrerem sistematicamente entre poucos indivíduos da população, a contribuição da população doadora de pólen para a formação da descendência pode ser afetada, aumentando a coancestria e reduzindo o tamanho efetivo da população.

O sistema misto de reprodução tem sido geralmente conceituado como a mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundações e desconsidera a ocorrência de cruzamentos biparentais, que também pode causar desvios de cruzamentos aleatórios. Os cruzamentos biparentais podem ser calculados pela correlação de paternidade (r_p , Ritland, 1989) que mede a proporção de indivíduos de cruzamentos que foram gerados por cruzamentos biparentais (irmãos completos, Ritland, 1989). A estimativa da correlação r_p em *M. huberi* foi de 18,9%, uma taxa relativamente alta e significativa no sentido de contribuir para a taxa de endogamia da espécie. A presença de correlação de paternidade em progênies de polinização aberta surge não da fertilização das flores por amostras de pólen aleatórias da população como um todo, mas sim devido a uma amostra de poucas fontes e eventos de polinização (Sampson, 1998).

Distância de fluxo de pólen

Devido ao fato de o movimento do pólen influenciar na criação, manutenção e erosão da estrutura genética da população adulta é importante entender quais fatores influenciam o movimento do pólen, daí a importância do conhecimento do fluxo gênico via pólen em uma

população natural. Se uma população doadora de pólen sofrer isolamento por distância, poderá haver um aumento amostral dos pais locais e a criação de uma alta estrutura no conjunto do pólen (Dyer & Sork, 2001).

A distância média de fluxo de pólen obtida por estimativas do *software* Two-gener foi extremamente baixa ($\hat{\delta}=49,5$ m). O fluxo de pólen restrito pode estar relacionado às características de biologia reprodutiva da espécie. A *M. huberi* possui eventos de floração supra anuais, entretanto intensos e a maioria das árvores em estágio de floração está florindo no mesmo momento. A intensa oferta localizada de flores faz com que os polinizadores forrageiem áreas restritas, não sendo necessário buscar alimento a longa distância. Os polinizadores da espécie são insetos como moscas e abelhas de tamanho médio, cujo alcance de vôo pode chegar a 2000 m, ou seja, muito superior à distância média de fluxo de pólen detectada. Contudo, o modelo Two-Gener tende a subestimar a distância de dispersão. O modelo assume ausência de estruturação espacial, o oposto do detectado nessa população.

Esse resultado estaria de acordo com a maioria dos trabalhos que relatam que há fluxo de pólen a longas distâncias em populações de outras espécies arbóreas tropicais como *Neobalanocarpus heimii* (Konuma *et al.*, 2000); *Dinizia excelsa* (Dick *et al.*, 2003); *Swietenia humilis* (White *et al.*, 2002). Ainda, esta é uma sub-estimativa da média de dispersão, visto que uma certa proporção das sementes foi fecundada por pais localizados fora da área.

A estimativa da divergência genética entre o pólen cruzado revelou que o pólen que fecundou as diferentes árvores maternas foi heterogêneo ($\Phi_{ft}=0,14$). Em outras palavras, 14% da variação nas frequências alélicas do pólen cruzado dentro da população encontravam-se entre as árvores maternas. Esta estimativa da divergência entre o pólen cruzado, obtida para *M. huberi* é muito superior à encontrada na espécie polinizada por animais *Albizia julibrissin* ($\Phi_{ft}=0,062$; Irwin *et al.*, 2003).

Conservação e manejo

Marcadores microssatélites tem sido uma importante ferramenta no sentido de gerar informações rápidas e detalhadas a respeito do cenário referente à diversidade e estrutura genética de uma população e assim ajudar na definição de estratégias de conservação e manejo florestal sustentáveis. Lemes *et al.* (2003) sugeriram estratégias de conservação *in situ* de *Swietenia macrophylla* baseadas na preservação de grandes áreas de modo a minimizar a perda de diversidade decorrente de deriva genética. Bottin *et al.* (2005), em seus estudos com *Santalum austrocaledonicum*, sugeriram estratégias de conservação e a definição de duas unidades de conservação (ESUs - *Evolutionary Significant Units*) com base na estimativa do índice F_{ST} .

A soma dos resultados obtidos nas análises de *M. huberi* com base em locos SSR como a detecção de desvios de cruzamentos aleatórios detectados nas frequências alélicas além da forte estruturação genética espacial têm fortes implicações em programas de melhoramento e conservação genética, coleta de sementes para a recuperação de áreas degradadas e reflorestamentos comerciais com *M. huberi*. O padrão de isolamento por distância detectado neste estudo é consistente com os resultados obtidos em outros estudos em larga escala de árvores tropicais como *Euterpe edulis* na Floresta Atlântica (Cardoso *et al.*, 2000) *Caryocar brasiliense* no Cerrado (Collevatti *et al.*, 2001) e *S. macrophylla* na região amazônica (Lemes *et al.*, 2003; Novick *et al.*, 2003).

O manejo florestal aplicado na Amazônia elimina dos eventos reprodutivos um grande número de indivíduos, i.e., 90% de todos aqueles que possuem DAP a partir de 45 cm, deixando apenas indivíduos jovens de menor diâmetro, que produzem menor quantidade de óvulo e pólen. As árvores maiores (em DAP e altura) e conseqüentemente mais velhas retiradas pelo manejo, apesar de estarem em menor número são as que de fato contribuem em maior proporção para a reprodução e conseqüentemente deveriam ser alvos prioritários no

estabelecimento de reservas genéticas *in situ*. Considerando a maior distância entre os indivíduos reprodutivos remanescentes, a probabilidade de indivíduos aparentados participarem do evento de reprodução na população poderá ser menor. Neste sentido, menor será a probabilidade de serem gerados indivíduos oriundos de cruzamentos entre parentes, entretanto, a probabilidade de autofecundação pode tornar-se elevada, também devido à maior distância entre as árvores reprodutivas remanescentes, sendo que a segunda situação deve ocorrer em menor intensidade no caso da *M. huberi* uma vez que a espécie é de alta densidade permanecendo na área muitos indivíduos reprodutivos (DAP entre 35 cm e 45 cm). Além do exposto, a viabilidade dos indivíduos gerados por autofecundação não é conhecida, sendo possível que estes não alcancem a maturidade sexual e reproduzam.

A redução da população reprodutiva pelo manejo pode causar um efeito conhecido como gargalo genético, que é o afunilamento da base genética da população, tendo como conseqüências a deriva genética, caracterizada pela perda de alelos de baixa freqüência, o aumento do grau de parentesco e dos níveis de endogamia das populações, os quais são elevados na população de *M. huberi* estudada.

A persistência ou o aumento drástico do nível de endogamia por deriva genética, autofecundação e cruzamento entre aparentados, poderá levar à redução na produtividade e capacidade reprodutiva (perda de vigor, capacidade adaptativa, redução no crescimento ou geração de plantas estéreis) e por fim, à erosão genética na população, podendo comprometer a continuidade da espécie. Entretanto, Dick (2001) relata que para *D. excelsa* a produção de sementes aumentou aproximadamente três vezes numa região que sofreu perturbação e a maioria foi originada por cruzamentos e não por autofecundação.

Possivelmente o manejo também cause alterações no comportamento de polinizadores, seja aumentando a probabilidade de autofecundação (Murawski, 1995), seja fazendo com que o polinizador busque árvores mais distantes, conseqüentemente, aumentando ou diminuindo a

endogamia da espécie, respectivamente. A densidade dos polinizadores também pode ser alterada uma vez que a oferta de alimento foi diminuída.

A definição de programas de conservação *in situ* por meio do estabelecimento de parques e reservas podem representar o componente mais significativo de estratégias de conservação, especialmente no caso de se tratar de áreas de floresta não fragmentada. Programas de manejo devem incluir grandes áreas no sentido de evitar a fragmentação florestal e conservar a maior diversidade genética possível, extraíndo árvores da floresta de forma aleatória dentro de grandes áreas, uma vez que a *M. huberi* é espacialmente estruturada e a fragmentação pode causar a perda de subpopulações. Essa estratégia pode minimizar a perda de diversidade genética por deriva genética e maximizar a eficiência da conservação da diversidade. Para a conservação *ex situ*, sementes devem ser coletadas de 188 árvores maternas no mínimo. Uma vez que a espécie apresenta alta distribuição pela região amazônica, a amostragem deve incluir o maior número de populações no sentido de conservar a maior diversidade genética possível e assim manter alto tamanho efetivo populacional. Com base na estrutura genética espacial detectada, a distância mínima entre as árvores maternas deve ser de 500 m de modo a evitar a coleta de sementes de árvores aparentadas.

As informações obtidas até o momento foram utilizadas no modelo que inter-relaciona todos os parâmetros característicos da espécie, o *software* Eco-Gene (Degen *et al.*, 1996), sendo possível realizar previsões realísticas sobre os efeitos do manejo nos níveis de diversidade genética e endogamia a longo prazo, e chegar mais próximo a um modelo de manejo sustentável para *M. huberi*. Esta abordagem está contemplada no Capítulo 04.

Finalmente, ressalta-se que o método utilizado no presente estudo é limitado para a obtenção de dados suficientes sobre os possíveis efeitos do manejo nos níveis de diversidade genética, devido a se tratar apenas do estudo de uma área natural, sendo necessário comparar esses resultados com os de áreas já manejadas. O ideal é que haja continuidade dos estudos

para avaliação dos incrementos médios anuais para determinar como será o crescimento e a produtividade por área da espécie. Outro aspecto que deve ser estudado é a taxa de recrutamento e mortalidade nas populações e a biologia de polinização, determinando-se a distância do fluxo de pólen e as taxas de cruzamento da espécie após o manejo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem uma série de conclusões sobre a estrutura genética da espécie *M. huberi*.

A espécie apresenta altos índices de diversidade genética molecular em comparação à média das espécies arbóreas tropicais. Entretanto apresenta alta taxa de endogamia, ou seja, desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, causado tanto por autofecundação quanto por cruzamento entre parentes.

Trata-se de uma espécie preferencialmente alógama, entretanto, com taxa significativa de autofecundação, que apresenta estruturação genética espacial, estando os indivíduos aparentados localizados num raio de cerca de 450 m. Esta intensa estruturação está relacionada ao fluxo gênico de isolamento por distância, o sugere a conservação de grandes áreas no sentido de evitar a perda de subpopulações devido à exploração seletiva.

A alta diversidade genética de *M. huberi*, a alta taxa de cruzamento e o fato de ser de ampla abrangência na Amazônia, são fatores que sugerem que a espécie apresenta potencial para conservação *in situ* e *ex situ*.

Para conservação *ex situ*, sementes devem ser coletadas de pelo menos 188 árvores maternas amostradas preferencialmente buscando representar o máximo de populações.

CAPÍTULO 03

Análise da variabilidade no DNA de cloroplasto em

***Manilkara huberi* (Ducke) A.Chev.**

RESUMO

A fragmentação florestal pode resultar numa diminuição do potencial evolutivo das espécies, tornando-as isoladas e vulneráveis a eventos ambientais, demográficos e genéticos. Neste sentido, estudos de genética molecular têm se tornado parte integrante de diversos estudos de conservação e devem passar a ser considerados na definição de estratégias de manejo florestal sustentável. A maçaranduba é uma espécie intensamente explorada pela indústria madeireira devido à alta densidade de sua madeira e atualmente se encontra sob manejo sustentável na Amazônia Brasileira. Estudos anteriores da variabilidade genética autossômica de uma população em floresta primária localizada na FLONA Tapajós, Belterra, PA, indicaram que a espécie apresenta elevada diversidade genética, embora apresente endocruzamento significativo ($f = 0,22$). Apresenta fluxo de pólen a distâncias limitadas (~49 m), alta taxa de cruzamento entre parentes (28%) e estruturação espacial, estando os indivíduos aparentados distantes em até 450 metros entre si. Com base nestes resultados e visando confirmar a estrutura genética espacial da espécie e seu padrão de fluxo gênico, este estudo teve como objetivo avaliar a existência de estruturação genética matrilinear desta mesma população de 481 indivíduos adultos distribuídos em 200 ha, e 88 regenerantes com base na análise de nove microssatélites no genoma de cloroplasto (cpSSR), associados ao seqüenciamento de três regiões intergênicas de cpDNA tipicamente polimórficas em 96 indivíduos adultos distribuídos pelos 200 ha. Não foi detectado polimorfismo de seqüência nestas regiões entre os indivíduos desta população. Além disso, a análise da variabilidade haplotípica envolvendo nove cpSSRs revelou não existir variação dentro da população para cinco locos enquanto os demais quatro apresentaram polimorfismo relativamente limitado, resultando em um total de 15 haplótipos na população, com diversidade genética total (h_T) de 0,898. A análise da estrutura genética espacial com base nos haplótipos de cpSSR confirmou a existência de estruturação significativa em distâncias até 200 m, indicando que os indivíduos fisicamente mais próximos são geneticamente mais relacionados do que esperado pelo simples acaso. Estas informações genéticas corroboram o padrão de organização espacial da variabilidade genética revelado pela análise de DNA nuclear fortalecendo a hipótese de isolamento por distância e a recomendação da necessidade de manutenção de grandes áreas de floresta primária de modo a garantir a sobrevivência do maior número de subpopulações da espécie.

Palavras-chave: cpDNA, sequenciamento, estrutura genética espacial, haplótipos

INTRODUÇÃO

Ecossistemas tropicais têm sofrido intensamente nos últimos anos em decorrência da intensa ação antrópica por meio da exploração de recursos madeireiros e não-madeireiros. Esta exploração predatória tem levado à destruição de grandes áreas, as quais representam refúgios de extensa diversidade de espécies. A fragmentação florestal pode resultar numa diminuição do potencial evolutivo das espécies, tornando-as isoladas e vulneráveis a eventos ambientais, demográficos e genéticos. Os efeitos genéticos associados à redução do tamanho populacional são primordialmente: a restrição no fluxo gênico, a deriva, o endocruzamento, o que geralmente resulta na diminuição da diversidade genética (Young *et al.*, 1996; Keller & Waller, 2002).

Neste sentido, estudos de genética molecular tem se tornado parte integrante de diversos estudos de conservação (Haig, 1998). Em plantas, os estudos comparativos de genoma nuclear, de herança biparental e citoplasmático, de herança geralmente uniparental, podem promover informações complementares e até mesmo contrastantes a respeito da estrutura genética de populações naturais (McCauley, 1995; Ennos *et al.*, 1999).

Em contraste com o observado em vertebrados, sementes de plantas apresentam comportamento de dispersão complexo e assimétrico, isso por que, os adultos são indivíduos fixos, imóveis e a função de dispersão é mediada por dois veículos distintos que operam em seqüência, o gametófito masculino (pólen) e o esporófito jovem (semente). Outra peculiaridade das plantas é o fato de possuírem dois genomas organelares coexistentes no citoplasma, o genoma mitocondrial e o plastidial, sendo este específico de plantas. A herança destes dois genomas é variada e nem sempre única, variando desde estritamente paterna até estritamente materna (Harris & Ingram 1992; Mogensen 1996; Reboud & Zeyl 1994; Röhr *et al.*, 1998).

Informações a respeito dos níveis de organização e dinâmica da variabilidade genética em populações de uma espécie são fundamentais para delinear estratégias eficientes de conservação e para a definição de estratégias de manejo sustentável. Entretanto, estudos desta natureza para espécies arbóreas tropicais ainda são relativamente poucos. Conhecer a variabilidade genética existente entre e dentro de populações é essencial para que possam ser feitas inferências e previsões sobre diversos processos que afetam a diversidade, como mutação, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural (Wright, 1978).

A obtenção e análise de dados discretos, a partir de marcadores moleculares baseados em polimorfismo de DNA, tem se tornado uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies. A evolução e disponibilização de técnicas de biologia molecular têm contribuído significativamente para investigações cada vez mais detalhadas da diversidade genética.

Tendo em vista a taxa de evolução lenta do genoma de cloroplasto (cpDNA), polimorfismos de haplótipos de microssatélites de cloroplasto e de fragmentos de restrição ou seqüenciamento de regiões intergênicas têm sido tradicionalmente utilizados para investigações filogenéticas interespecíficas ou intergenérica. Trata-se uma molécula altamente conservada, com baixa taxa de substituição de nucleotídeos. As alterações ocorrem principalmente no tamanho do genoma, por meio de adição de novas seqüências ou deleção de seqüências existentes, geralmente pequenas, envolvendo de 1 a 10 pares de base localizados em regiões não codificadoras. O genoma de cloroplasto em plantas terrestres é uma molécula circular e pequena, variando de 120 a 217 Kb. Sua estrutura é bem documentada, caracterizada na maior parte das espécies por uma repetição invertida de cerca de 25 Kb, que divide o restante do genoma em duas regiões de cópia única, sendo uma maior (87 Kb) e uma menor (18 Kb) (Palmer, 1987).

O uso mais freqüente do DNA de cloroplasto tem sido para estudos ao nível interespecífico, devido à lenta evolução desta molécula e conseqüentemente baixo polimorfismo dentro de espécies (Palmer, 1987). Entretanto, estudos já revelaram que a diversidade intraespecífica no cpDNA pode ser suficiente para estudos populacionais (Soltis *et al.*, 1992). Weising & Gardner (1999) desenvolveram uma série de marcadores SSR de cloroplasto altamente conservados e universais para angiospermas. Em seus testes, a grande maioria dos locos apresentou polimorfismo nas famílias de angiospermas dicotiledôneas testadas. Baseados nos resultados encontrados, os autores sugeriram que os iniciadores universais desenvolvidos baseados em seqüências repetitivas mononucleotídicas podem ser utilizadas em angiospermas de modo geral. Taberlet *et al.* (1991) desenvolveram iniciadores universais que tornaram possível a amplificação via PCR e seqüenciamento direto de duas regiões não codificadoras, tornando mais acessível o DNA de cloroplasto para estudos intraespecíficos.

Estudos anteriores da variabilidade genética autossômica de uma população em floresta primária localizada na FLONA Tapajós, Belterra, PA, indicaram que a espécie apresenta elevada diversidade genética, embora apresente endocruzamento significativo ($f = 0,22$). Apresenta ainda um fluxo de pólen a distâncias limitadas (~49 m), alta taxa de cruzamento entre parentes (28%) e estruturação espacial, estando os indivíduos aparentados distantes em até 450 metros entre si. Com base nestes resultados e visando confirmar a estrutura genética espacial da espécie e seu padrão de fluxo gênico, este estudo teve como objetivo investigar a possível existência de estruturação genética matrilinear desta mesma população de 481 indivíduos adultos distribuídos em 200 ha, com base na análise de nove microssatélites no genoma de cloroplasto (cpSSR), associados ao seqüenciamento de três regiões intergênicas de cpDNA tipicamente polimórficas. A comparação do polimorfismo de seqüências nucleares e citoplasmáticas poderá auxiliar o entendimento das contribuições da

dispersão de semente e pólen na definição da estrutura genética de *M. huberi* na Amazônia Brasileira. Esta análise comparativa permitiria ainda fazer inferências sobre o passado da espécie, e definir se o nível e a distribuição espacial da diversidade genética observada atualmente representa um processo recente ou é característico da espécie a longo prazo.

OBJETIVOS

Objetivo geral.

Este trabalho teve como objetivo estudar a estrutura genética de *M. huberi* com base na análise de microssatélites e seqüenciamento de regiões intergênicas no genoma cloroplástico não recombinante e comparar os resultados com aqueles derivados da análise da variabilidade de microssatélites nucleares do genoma recombinante.

Objetivos específicos.

- ✓ Genotipar população natural de *M. huberi* com locos universais SSR de cpDNA;
- ✓ Seqüenciar três fragmentos de regiões intergênicas de cpDNA visando detectar polimorfismo de base individual e inserção/deleção;
- ✓ Estimar a diversidade haplotípica do cpDNA;
- ✓ Investigar a distribuição genética espacial dos indivíduos, e testar a hipótese de existência de estruturação genética;
- ✓ Comparar os resultados de estrutura genética com base em cpDNA com aqueles obtidos da análise de marcadores autossômicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo, amostragem e material vegetal

A população de *M. huberi* estudada localiza-se em 200 hectares de floresta primária de terra-firme da Amazônia Brasileira, em área da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA Tapajós), na altura do km 83 da BR 163, Rodovia Santarém-Cuiabá, Belterra-PA (Figura 2.1). No total, a amostra populacional para os estudos genéticos constituiu-se de 481 árvores com DAP a partir de 10 cm e 88 regenerantes (DAP < 10cm) com alturas variando entre 13 e 190 cm e localizados na área de 500 ha, os quais fazem parte de uma PEI (Parcela de Estudos Intensivos) destinada a estudos ecológicos e genéticos no âmbito do projeto Dendrogene (Embrapa Amazônia Oriental/DFID). Os tecidos vegetais utilizados para a extração de DNA foram do câmbio caulinar das árvores, e folhas dos regenerantes.

Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA genômico e a genotipagem dos indivíduos foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF. Tanto a extração do DNA de câmbio quanto de folhas foi realizada de acordo com o procedimento de CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987) adaptado por Machado *et al.* (2002). A quantificação do DNA foi feita por comparação com DNA padrão (λ DNA) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O DNA foi diluído para 1,0ng/ μ l.

Otimização de locos cpSSR

Os dez iniciadores SSR universais de cpDNA sintetizados baseados no genoma de tobacco (Weising & Gardner, 1999), todos de repetições de uma base foram testados em

reações de PCR utilizando DNA de oito árvores de *M. huberi* a fim de se obter a temperatura de anelamento ideal para cada par de iniciadores. Para isto foram testadas temperaturas que variaram entre 50 e 62°C. A reação de PCR consistiu da seguinte combinação de reagentes: 4 ng de DNA, 1x de tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 2 mM de MgCl₂, 0,27 µM de cada iniciador, 0,25 mM de dNTP, 0,25 mg/ml de BSA, 1,3 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura. Em cada par de iniciadores, o *forward* foi marcado com fluorescência para leitura em analisador automático de fragmento.

Para as reações foi utilizado o seguinte programa no termociclador ABI9700 (Applied Biosystems): 94°C por 10 minutos, 30 ciclos a 94°C 1 minuto, T_a (Tabela 3.1) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. A temperatura de anelamento foi variada de modo a aumentar a especificidade e eficiência de anelamento de cada par de iniciadores. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio. A partir dos resultados das amplificações, as detecções de polimorfismo foram realizadas em analisador automático de fragmentos ABI 3700 da Applied Biosystems utilizando-se 481 indivíduos adultos de *M. huberi* e 88 regenerantes procedentes da área de estudo na Floresta Nacional do Tapajós, Pará.

As reações de PCR foram realizadas separadas para cada loco e foram utilizados, quando possível, sistemas *multiplex* onde os produtos de cada loco foram analisados conjuntamente na eletroforese para detecção dos alelos por fluorescência. Cada reação realizada separadamente foi diluída (5:1), e sistemas *multiplex* contendo dois ou três locos foram montados utilizando SSR marcados com diferentes fluorocromos, ou com mesmo fluorocromo, porém com amplitudes alélicas distintas, os quais foram misturados junto com 10 µl de um *mix* contendo formamida HiDi (9µl), marcador interno (ROX) (0,25 µl) e água ultrapura (0,75 µl). O marcador interno fluorescente utilizado foi o desenvolvido por

Brondani & Grattapaglia (2001). Esta mistura foi desnaturada por 5 minutos a 95°C e submetida à eletroforese.

Devido à possibilidade de inexatidão na determinação do tamanho exato do fragmento causado por possível escorregamento da Taq DNA polimerase e devido a possíveis variações entre géis, dois indivíduos foram utilizados como controle em todas as placas.

Seqüenciamento de DNA plastidial

Para as análises via seqüenciamento de três regiões intergênicas de cpDNA (Taberlet *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1991) foram selecionados aleatoriamente 96 indivíduos de *M. huberi* distribuídos ao longo dos 200 ha na área da FLONA Tapajós (Figura 3.1). Foram seqüenciadas três regiões intergênicas de DNA plastidial: o segmento amplificado com o par de iniciadores cpC e cpD, amplificando o íntron do gene *trnL* (UAA); o segmento amplificado com o par de iniciadores cpE e cpF, que amplifica o espaço intergênico entre o éxon *trnL* (UAA) e *trnF* (GAA) (Taberlet *et al.*, 1991); e o segmento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que codifica para a região 16S de ribossomo, região amplificada com o par de iniciadores Y₁ e Y₂ (Young *et al.*, 1991).

Para as reações de PCR foram utilizados 2 ng do DNA molde de *M. huberi*, 1x de tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, , 0,2 mg/ml de BSA, 0,2 µM de cada iniciador, 1 U de Taq polimerase e água ultrapura estéril, completando para o volume final de 10µl. As reações foram realizadas utilizando termociclador 9700 (Applied Biosystems). Para as amplificações das três regiões de DNA plastidial foi utilizado o seguinte programa: 94°C por 5 minutos, 25 ciclos a 94°C 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 2 minutos. Para a confirmação e quantificação da amplificação, 5 µl da reação foram aplicados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (1 mg/ml).

Para as reações de seqüenciamento o produto de PCR foi purificado utilizando Exonuclease I e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (0,25 U de cada enzima em 5 µl de reação) por uma hora a 37°C. Após esse tempo a atividade enzimática foi neutralizada, expondo a reação à 80°C por 30 min. Para as reações de seqüenciamento foram utilizados o Kit da Applied Biosystems (BigDye terminator v3.1, Applied Biosystems) e iniciadores citados acima. Para cada reação de seqüenciamento de 10 µl foram utilizados de 20 ng de DNA (produto da PCR), 1,6 µM de iniciador *forward* ou *reverse*, 1 µl da solução pré-mix do kit de seqüenciamento, 2 µl de tampão *save money* e água ultrapura. A reação de seqüenciamento foi realizada de acordo com o programa a seguir: 94°C por 2 minutos, 30 ciclos a 94°C 10 segundos, 50°C por 10 segundos, 60°C por 4 minutos. A corrida eletroforética das amostras foi realizada em seqüenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems). O protocolo de purificação da reação de seqüenciamento utilizado foi de precipitação por Etanol/EDTA proposto pelo fabricante (Applied Biosystems – BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit).

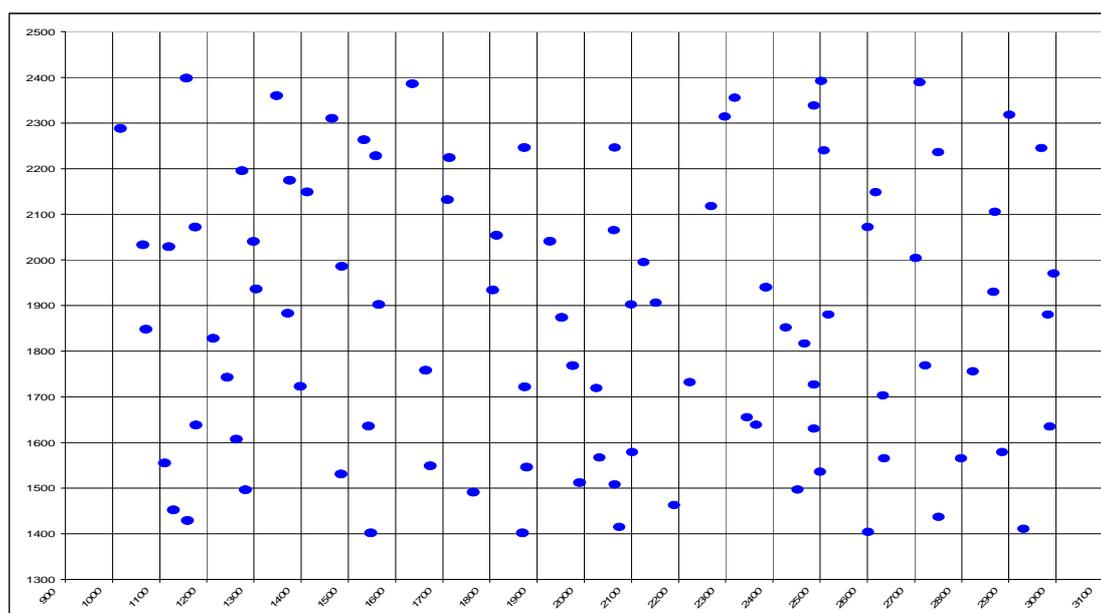


Figura 3.1. Distribuição dos 96 indivíduos de *M. huberi* selecionados para as análises de polimorfismo de seqüência de cpDNA. Cada retícula equivale a 1 ha.

Análise dos dados

cpSSR. Os locos cpSSR foram analisados quanto ao número de alelos por loco e número total de haplótipos únicos dentro da população. A diversidade genética populacional (h_T) foi calculada utilizando o *software* Permut (Pons & Petit, 1996). As coordenadas geográficas dos indivíduos foram registradas com o uso de GPS e as estimativas de estruturação genética espacial foram obtidas por meio de cálculo do Índice I de Moran (Sokal & Oden, 1978). Para isso, todos os possíveis pares de árvores foram considerados como um conjunto e foram acessados para cada uma das 19 classes de distâncias pré-definidas. A significância total do correlograma foi testada usando critérios de Bonferroni. As análises de autocorrelação espacial e os testes foram realizados utilizando-se o *software* SGS (Degen, 2003).

Os resultados obtidos foram confirmados utilizando o *software* SPAGeDi versão 1.1 (Hardy & Vekemans, 2003) que calcula o coeficiente de coancestria (θ_{xy}) entre pares de árvores. Este coeficiente foi estimado para 10 classes de distância estabelecidas, usando o coeficiente de coancestria proposto por Loiselle *et al.* (1995).

Seqüenciamento. As análises dos produtos de seqüenciamento foram realizadas utilizando o *software* BioEdit. As seqüências de 96 indivíduos adultos foram alinhadas e nos casos onde variação de seqüência (deleção, inserção ou substituição) foi detectada, duas novas reações de seqüenciamento foram realizadas para confirmação do polimorfismo.

RESULTADOS

Diversidade haplotípica

Dez locos cpSSR foram utilizados nas análises preliminares dos quais nove amplificaram fragmentos de fácil interpretação. As temperaturas de anelamento ideais, definidas para cada loco variaram entre 50 e 62°C (Tabela 3.1). Nas análises conduzidas com vistas à detecção de polimorfismo intraespecífico, seis não apresentaram variação haplotípica. O número de alelos por loco polimórfico variou de dois a quatro (Figura 3.2). Foram observados somente 15 haplótipos diferentes dentro da população adulta composta por 481 indivíduos. Um dos haplótipos apresentou frequência de 60% e quatro haplótipos foram observados somente em um indivíduo.

Tabela 3.1 Locos cpSSR utilizados nas análises da população de *M. huberi*.

Loco	Região	Seqüência dos iniciadores (5' – 3')	Amplitude alélica esperada*	Amplitude alélica observada	SSR	Ta (°C)	Nº alelos
ccmp01	trnK intron	F: CAGGTAACTTCTCAACGGA R: CCGAAGTCAAAAGAGCGATT	122-143	136-144	(T) ₁₀	56	4
ccmp02	5' to trnS	F: GATCCCGGACGTAATCCTG R: ATCGTACCGAGGGTTTCAAT	166-234	209	(A) ₁₁	62	1
ccmp03	trnG intron	F: CAGACCAAAAGCTGACATAG R: GTTTCATTCCGGCTCCTTTAT	89-119	114-116	(T) ₁₁	60	2
ccmp04	atpF intron	F: AATGCTGAATCGAYGACCTA R: CCAAAAATATTBGGAGGACTCT	115-220	136	(T) ₁₃	60	1
ccmp05	3' to rps2	F: TGTCCAATATCTTCTGTGATTT R: AGGTTCCATCGGAACAATTAT	77-145	112-115	(C) ₇ (T) ₁₀	56	4
ccmp06	ORF 77-ORF 82	F: CATGCATATGTAGAAAGCC R: CATTACGTGCGACTATCTCC	93-111	114	(T) ₅ C(T) ₁₇	62	1
ccmp07	atpB-rbcL	F: CAACATATAACCACTGTCAAG R: ACATCATTATTGTATACTCTTTC	129-151	140-147	(A) ₁₃	56	3
ccmp09	ORF 74b-psbB	F: GGATTTGTACATATAGGACA R: CTCAACTCTAAGAAATACTTG	96-104	98	(T) ₁₁	50	1
ccmp10	rpl2-rps19	F: TTTTTTTTAGTGAACGTGCA R: TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	91-300	105	(T) ₁₄	56	1

Oito haplótipos foram identificados entre os regenerantes, dentre estes foram detectados dois novos haplótipos em relação àqueles detectados na população adulta, o que é passível de ocorrer uma vez que a amostragem de regenerantes englobou uma área significativamente maior. O haplótipo mais freqüente entre os regenerantes foi o mesmo na

população adulta. A diversidade genética total (h_T) da geração de adultos foi de 0,898 ($\pm 0,0126$). A média de diferença entre os 15 haplótipos encontrados foi de 3,52, semelhante ao encontrado para *C. guianensis* (Cloutier *et al.*, 2005). A diversidade genética total (h_T) dos 94 regenerantes foi de 0,986 ($\pm 0,0019$).

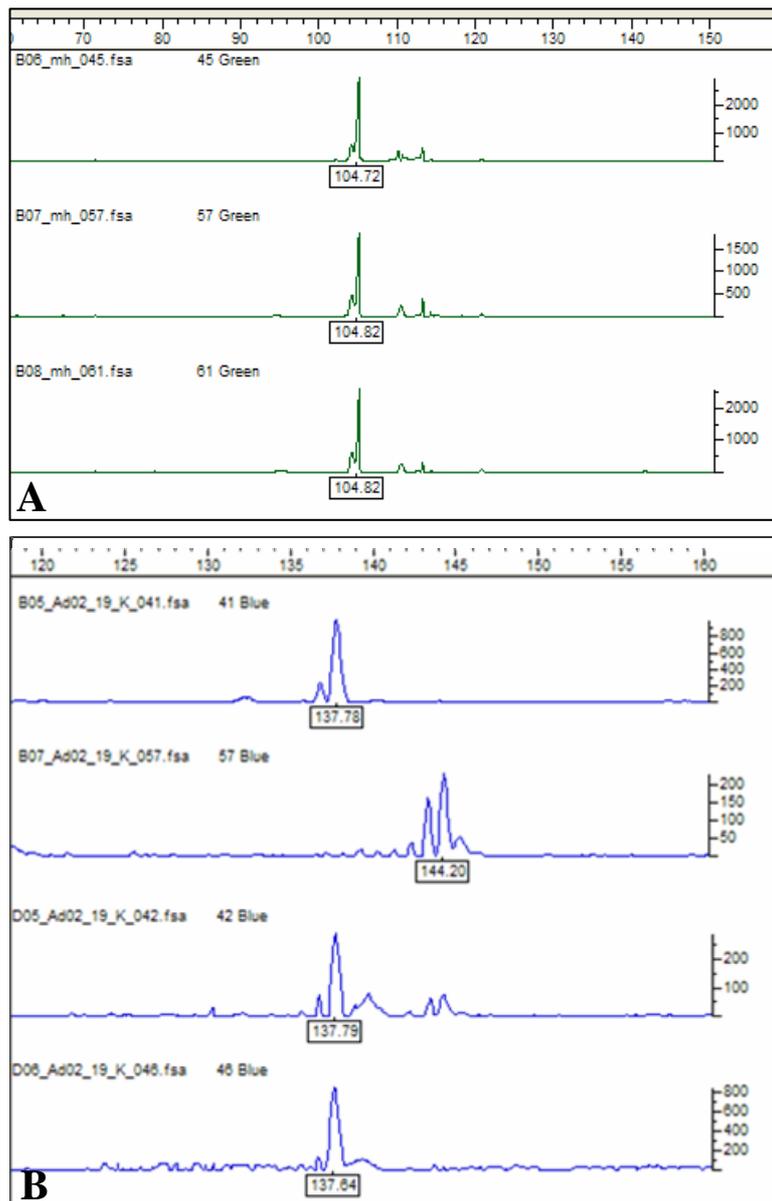


Figura 3.2. Exemplos das análises de cpSSR. A) Loco ccmp10, sem variação haplotípica. B) Loco ccpm01, com variação haplotípica.

Distribuição espacial dos haplótipos

A análise da correlação genética espacial (Figura 3.3) detectou, por meio de cálculos utilizando o Índice I de Moran a presença de estruturação até uma distância de aproximadamente 200 m, limite até o qual valores positivos e significativos foram estimados para I (IC 95%) sugerindo que árvores próximas sejam geneticamente relacionadas por ancestral comum, provavelmente pais, filhos e irmãos. Foi observada diminuição contínua na autocorrelação, que a partir de 1900 m apresentou valores negativos significativos, indicando que árvores espacialmente distantes entre si tendem a não ser geneticamente relacionadas.

O histograma do coeficiente de coancestria (Loiselle *et al.*, 1995) entre os genótipos de *M. huberi* obtido utilizando o *software* SPAGeDi também evidenciou estrutura genética espacial significativa até uma distância de aproximadamente até 150 m (Figura 3.4), sugerindo dispersão de sementes restrita a esse espaço. Corroborando com o resultado obtido pelo índice I de Moran, foram detectados valores negativos significativos a partir de cerca de 1900 metros, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% do teste de reamostragem.

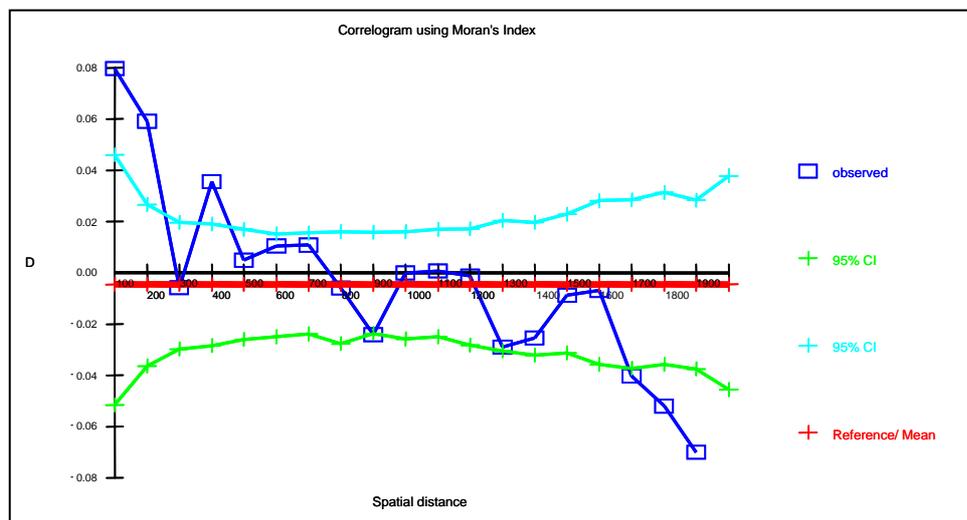


Figura 3.3. Correlograma do índice I de Moran para 20 classes de distância na população natural de *M. huberi*.

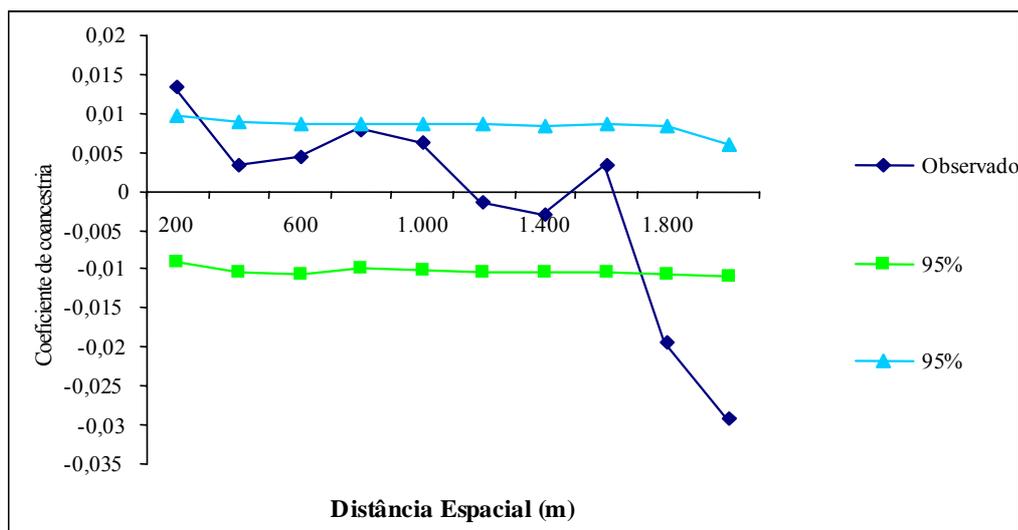


Figura 3.4. Histograma do coeficiente de coancestria de acordo com Loiselle *et al.* (1995) para 20 classes de distância na população natural de *M. huberi*.

Polimorfismo de seqüências

As ampliações das regiões não codificadoras utilizando os pares de iniciadores cpC-cpD, cpE-cpF e Y₁-Y₂ geraram fragmentos de 525 pb, 362 pb e 260 pb respectivamente. Polimorfismos de seqüência basicamente do tipo pontuais, como pequenas inserções ou deleções de até três bases e substituições de uma base foram encontrados em todas as regiões seqüenciadas. Com o objetivo de confirmar os raros potenciais polimorfismos observados, todos os segmentos foram re-seqüenciados nos dois sentidos. Em nenhum caso o polimorfismo observado inicialmente foi de fato confirmado, de modo que nenhuma variação de seqüência foi detectada por meio desta análise (Figura 3.5). A ausência de polimorfismo intrapopulacional era de certa forma esperado tendo em vista a herança matrilinea e a taxa lenta de evolução do cpDNA. Variabilidade de seqüência no cpDNA é tipicamente observado ao se analisar indivíduos de diferentes populações, como o observado nas análises de *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al.*, 2003), cujos indivíduos estudados eram provenientes

de sete Estados brasileiros, estando, portanto, distribuídos em populações distantes entre si em escala geográfica.

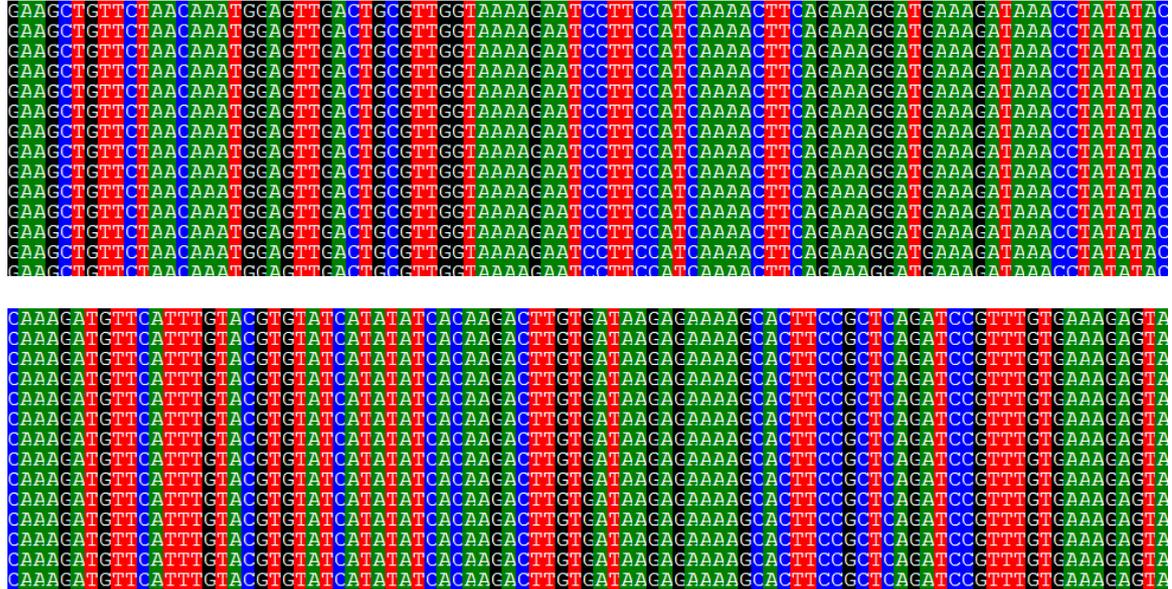


Figura 3.5. Exemplos de alinhamentos de seqüências idênticas de cpDNA de *M. huberi*.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos o DNA plastidial tem sido utilizado com maior frequência em estudos de genética de populações especialmente devido a sua herança tipicamente uniparental, modo de evolução (clonal) e baixa taxa de mutação. A grande parte dos estudos, tem se baseado no método de PCR-RFLP, com base em iniciadores universais, analisando toda a molécula de cpDNA (Caron *et al.*, 2000; Cloutier *et al.*, 2006; Prentice *et al.*, 2003). Entretanto, novos estudos vêm surgindo, os quais têm se baseado em análises de polimorfismos de cpSSR universais ou seqüenciamento de regiões intergênicas (Collevatti *et al.*, 2003; Lian *et al.*, 2003; Lira *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2006). Devido ao fato de ser uma molécula altamente conservada entre as espécies de angiospermas, o DNA plastidial permite essa utilização em nível universal, não sendo necessário, como no caso de DNA nuclear, isolar seqüências específicas de SSR.

Apesar de este trabalho contemplar apenas uma população, entretanto, de ampla abrangência, os resultados encontrados são significativos, sendo possível inferir a respeito de um padrão geográfico de variação haplotípica. Os resultados obtidos nas análises com cpSSR confirmam os obtidos em estudos prévios com SSR nuclear, que indicam a presença de estruturação genética espacial, sugerindo que a população estudada é formada por subpopulações, resultante de fluxo gênico restrito. Resultados semelhantes foram encontrados para outras espécies de regiões tropicais (Caron *et al.*, 2000; Collevatti *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2006). Espera-se que nas regiões tropicais a distribuição geográfica do polimorfismo de cpDNA seja mais complexa do que no continente europeu, uma vez que nos trópicos as zonas de refúgio durante as glaciações foram caracterizadas por pequenas áreas de ampla distribuição (Prance, 1982). Vale ressaltar ainda que, apesar de se ter como certa a herança materna do DNA plastidial em angiospermas (e.g. Byrne *et al.*, 1993), algumas exceções são

passíveis de ocorrer (Harris & Ingram, 1991), de modo que uma eventual herança paterna possa ocorrer influenciando a diversidade haplotípica intraespecífica levando, conseqüentemente, à inferência errônea de múltiplas linhagens maternas. Neste sentido, a verificação da herança materna do DNA plastidial em *M. huberi* seria recomendada. Mesmo assim, caso a herança paterna ocorra de forma rara seria necessária a análise de um grande número de transmissões de cpDNA entre pais e filhos para efetivamente excluir categoricamente a possibilidade de herança paterna.

Como *M. huberi* é uma espécie de ampla distribuição, este padrão de sub-estruturação populacional pode ser resultado de um fluxo gênico ocorrendo sob o modelo de isolamento por distância. Este padrão pode ter surgido devido à perda de dispersores eficientes de semente, o que levou a limitação da eficiência de dispersão, fazendo com que as sementes se mantivessem próximas às árvores maternas, sendo dispersas principalmente pela gravidade e deste modo causando o isolamento e estruturação de demes de plantas compartilhando a mesma linhagem materna. Uma vez que este estudo baseia-se em apenas uma população, questões a respeito do processo evolutivo da espécie, tais como a formação de refúgios devido às glaciações, não são possíveis. Para um estudo neste nível seria necessária a análise de diversas populações distribuídas em uma extensão geográfica de maior abrangência.

CONCLUSÃO

A análise da variabilidade genética do cpDNA permite concluir que o padrão de estruturação da população de *M. huberi* em subpopulações de indivíduos geneticamente mais próximos confirma os resultados obtidos pelas análises de DNA de genoma nuclear. Estes resultados reforçam a recomendação de visar grandes áreas para preservação, evitando-se a fragmentação, no sentido de efetivamente conservar a diversidade genética da espécie organizada em subpopulações geneticamente diferentes, de modo a garantir a continuidade evolutiva da espécie.

CAPÍTULO 04

**Impacto da exploração seletiva na diversidade genética e demografia de
Manilkara huberi (Ducke) A.Chev.: geração de indicadores o manejo
sustentável da espécie**

RESUMO

Análises de cenários de exploração florestal por meio de modelos de simulação são úteis para a análise da dinâmica temporal e espacial em sistemas complexos de florestas tropicais úmidas, para avaliar os possíveis efeitos a longo prazo sobre a diversidade genética. O modelo de simulação Eco-Gene foi desenvolvido para a realização de estudos de dinâmica temporal e espacial da estrutura genética de populações arbóreas. Este modelo combina elementos de genética de populações (dinâmica de alelos e frequências genotípicas), dinâmica demográfica, crescimento e manejo. Neste trabalho, por meio da utilização do Eco-Gene, objetivou-se estimar o impacto de diferentes cenários de exploração madeireira na diversidade e estrutura genética e demográfica da espécie *M. huberi* com o intuito de avaliar os possíveis impactos da Exploração de Impacto Reduzido - EIR, legislação vigente no momento para o segmento florestal produtivo. Além do cenário padrão de exploração outros doze cenários foram testados alterando-se os ciclos, o DAP mínimo de corte e a percentagem de corte permitida. As simulações, realizadas com base em informações ecológicas, fenológicas e genéticas obtidas do estudo em uma população de floresta natural primária, na Floresta Nacional do Tapajós, Belterra - PA, sugerem uma necessidade de re-avaliação das atuais recomendações e aplicação aos planos de manejo com ciclos de corte mais longos de modo a garantir a regeneração desta espécie na floresta. Dentro os cenários testados, o mais favorável é que se baseia em ciclos de 90 anos de corte. Dentro das recomendações atuais permitidas por lei, a *M. huberi* necessitaria de 130 anos para recuperar a sua área basal original, deixando evidente a insustentabilidade dos atuais ciclos de 30 anos recomendados. Torna-se claro o entendimento crescente da biologia das espécies para uma redefinição de políticas públicas mais eficientes em relação à sustentabilidade da exploração madeireira e ao uso e conservação dos recursos florestais a longo prazo.

Palavras-chave: modelagem computacional, manejo florestal, políticas públicas.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com grande vocação florestal, apresentando em torno de 6,8 milhões de hectares de florestas plantadas e 385 milhões de hectares de florestas nativas. As florestas nativas tropicais possuem alta complexidade de sua composição, uma vez que são compostas por um grande número de espécies com os mais diferentes potenciais silviculturais, ecológicos e tecnológicos, e apesar disso, poucas são as informações que se tem sobre as dinâmicas de crescimento e reprodução, seja em áreas intactas, seja em áreas exploradas ou ainda em áreas sujeitas a regime de manejo (Scolforo, 1996). A cada ano, cerca de 30 milhões de metros cúbicos de toras são extraídos das florestas da Amazônia. A demanda por madeiras da Amazônia cresceu, principalmente, após a destruição da Mata Atlântica, que era a principal fonte de matéria prima do Brasil. Associado a essa exploração a floresta tem sido convertida em pastagens e grandes áreas de plantações (Asner *et al.*, 2005).

Desde 1965 o governo brasileiro busca estabelecer regras em relação à exploração madeireira florestal, entretanto somente em 1995 (Decreto nº 1.282, de 19.10.1995) foi definido o plano de manejo florestal para a Amazônia. Esta regulamentação define que a exploração deve gerar benefícios sociais, respeitando-se os mecanismos de sustentação do ecossistema, i.e., o manejo sustentável deve ser economicamente viável, socialmente justo e ecologicamente correto. No entanto o que se observa é que o manejo florestal promovido é arbitrário com relação às espécies, como se todas fossem iguais e afetadas da mesma maneira e intensidade pela exploração seletiva. Neste sentido, a Amazônia vem sofrendo com a implantação de modelos ecologicamente insustentáveis. Além disso, infelizmente o que ocorreu de fato foi a regulamentação da exploração predatória, uma vez que os órgãos do governo não dispunham de estratégias eficientes de avaliação das propostas de manejo formuladas pelas madeireiras e de fiscalização da exploração executada. Em 1996, o relatório

da Embrapa Amazônia Oriental, em colaboração com o Ibama (Embrapa, 1996), mostrou que os madeireiros não cumpriam a maioria das atividades prometidas nos planos de manejo na região de Paragominas no Pará.

Uma série de fatores deve ser considerada na formulação de um sistema de manejo. Um dos importantes pontos a serem abordados para a exploração florestal é a definição do ciclo de corte, além do conhecimento de como as árvores por classe de diâmetro desenvolvem-se ao longo do tempo e o diâmetro mínimo de árvores reprodutivas. Dentre outros, devem ser considerados fatores como suscetibilidade das espécies florestais à exploração; a viabilidade econômica do manejo sustentado; maior eficiência no processo de beneficiamento e aproveitamento da madeira; a racionalização das técnicas de exploração e transporte, dentre outras.

De acordo com Barreto *et al.* (1998), caso as áreas de floresta sejam abandonadas após a exploração predatória, serão necessários aproximadamente 75 a 100 anos para uma segunda extração com volume similar ao da extração atual. Mas se as florestas forem manejadas cuidadosamente, o ciclo de extração pode ser reduzido para 30 a 40 anos. Entretanto, a exploração na Amazônia Oriental é usualmente feita de forma descuidada e, embora a extração seja seletiva com somente poucas árvores removidas por hectare, as florestas exploradas são geralmente deixadas em um estado altamente degradado (Uhl & Vieira, 1989; Uhl *et al.*, 1991; Veríssimo *et al.*, 1992).

A adoção de uma série de medidas de planejamento e técnicas de exploração pode conduzir a redução substancial dos danos (Exploração de Impacto Reduzido – EIR) em todas as fases da exploração. Cuidados como: retirada prévia de cipós, de modo a evitar danos nas copas das árvores que não serão retiradas; planejamento de queda das árvores, de modo a causar menor impacto nas remanescentes; planejamento de estradas, visando causar menor impacto gerando menores clareiras; e utilização de equipamentos adequados, como trator

florestal de rodas ou trator de esteira com guincho, causam menor dano à floresta e possibilitam recuperação mais rápida (Johns, 1998).

A fragmentação florestal poder ser causada pela substituição da floresta por áreas de agricultura e pecuária e pelo desmatamento. Ambos reduzem a continuidade da floresta, criando pequenos fragmentos florestais, gerando o risco de perda de populações e isolamento (Cascante *et al.*, 2002). Esta alteração causada pela remoção de árvores, e conseqüentemente alelos pode levar a uma alteração da estrutura genética devido a alterações no fluxo gênico da população remanescente, afetando a habilidade reprodutiva dos indivíduos. Áreas fragmentadas onde existem pequenas populações estão propensas à endogamia e deriva genética resultantes da subdivisão. A endogamia pode atuar desmascarando alelos deletérios recessivos, principalmente de plantas alógamas, levando a diminuição do valor adaptativo da população a curto prazo, causando redução da heterozigosidade, podendo resultar em perda de diversidade alélica. Biólogos e conservacionistas acrescentam que este declínio na variação genética pode inibir no futuro a adaptação do organismo às mudanças ambientais e conseqüentemente limitar seu potencial evolucionário, podendo levar essas populações a um possível risco de extinção (Zucchi, 2002), uma vez que populações com diversidade genética reduzida são mais susceptíveis à doenças e alterações ambientais, causando assim redução na produtividade. Uma das alterações mais evidentes da retirada de árvores madeireiras da floresta é a diminuição no número de indivíduos na população, principalmente os reprodutivos, cujos efeitos na dinâmica biológica podem ser a deriva genética e o aumento da endogamia podendo causar isolamento espacial e reprodutiva dos indivíduos remanescentes.

A necessidade de detectar as conseqüências da exploração predatória, fenômeno comum em florestas no mundo todo tem levado à busca do uso racional das florestas a partir da quantificação dos efeitos desta exploração também, na estrutura genética e conseqüentemente no sucesso reprodutivo das plantas e assim projetar cenários futuros de

modo a detectar possíveis alternativas que permitam a conservação da biodiversidade das espécies em diferentes níveis. Esses estudos em sua maioria são baseados em experimentos de campo, mas se registra também um crescente número de pesquisas surgindo na área de modelagem (Barreto *et al.*, 1998; Cascante *et al.*, 2002; Degen *et al.*, 2002; 2006; Nason & Hamrick, 1997; Rajora *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 1997; Sebbenn *et al.*, 2000a; Schulze *et al.*, 2005; van Gardingen *et al.*, 2006; Valle *et al.*, 2006; Sebbenn *et al.*, 2007 submetido).

Diferentes modelos de simulação têm sido utilizados em genética florestal com o objetivo de entender e prever o impacto de processos simples na estrutura genética populacional. Um exemplo é o modelo de reprodução mista de Ritland & Jain (1981) que tem sido utilizado para a uma série de espécies com o objetivo de estimar proporções de autofecundação, cruzamento e cruzamento entre parentes. Apesar disto a maioria destes estudos, especialmente os de campo, se baseiam em dados de pré e pós-exploração em curto intervalo de tempo, não sendo capazes de detectar o impacto da exploração a longo prazo. Neste sentido análises de cenários com o modelo de simulação devem possibilitar a geração de resultados úteis para análise da dinâmica temporal e espacial em sistemas complexos de florestas tropicais. É crucial também que essas simulações possam ser baseadas em dados reais populacionais e considerando as políticas públicas vigentes para o segmento produtivo.

O modelo de simulação Eco-Gene foi desenvolvido para a realização de estudos de dinâmica temporal e espacial da estrutura genética de populações arbóreas (Degen *et al.*, 1996). Este modelo combina elementos de genética de populações (dinâmica de alelos e frequências genotípicas), dinâmica demográfica, crescimento e manejo. Gerações sobrepostas ou separadas podem ser “criadas” e diferentes processos como fluxo gênico, sistema de cruzamento, fenologia, seleção podem ser implementados. O que implica no envolvimento de fatores estocásticos e determinísticos. O programa pode ainda ser utilizado baseando-se em dados reais ou fictícios (Degen & Watson, 2004).

Neste sentido, os objetivos do *software* são promover análises de interações genéticas em populações complexas, visando compreender a complexidade das interações; testar hipóteses no sistema genético de populações arbóreas; analisar os efeitos da atividade humana na estrutura genética de populações naturais e a partir desses resultados abrir uma discussão mais ampla para o manejo sustentável de recursos florestais incluindo uma base genética (Figura 4.1; Degen & Watson, 2004).

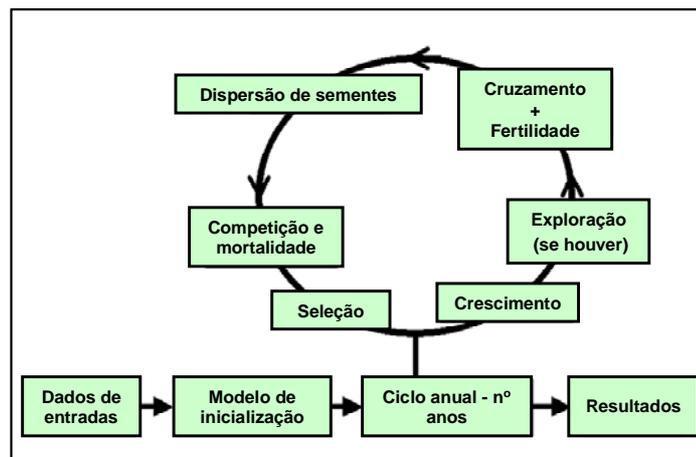


Figura 4.1: Fluxograma de uma simulação com Eco-Gene (Degen & Watson, 2004 – adaptado).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste capítulo é utilizar o modelo de simulação Eco-Gene versão Tropical, visando, por meio de simulações, estimar o impacto de diferentes cenários de exploração na diversidade e estrutura genética e demográfica da espécie *M. huberi* com o intuito de ampliar uma discussão da sustentabilidade dos planos de manejo com a perspectiva de informações baseadas em nível de espécies.

Objetivos específicos.

- ✓ Gerar uma população ideal utilizando dados reais obtidos com as análises de microssatélites;
- ✓ Simular uma população real controle, sem exploração;
- ✓ Simular diferentes cenários de exploração;
- ✓ Comparar os diferentes cenários de exploração, entre si e com a população natural (sem exploração);
- ✓ Buscar um cenário que dê suporte a um uso e conservação da espécie da maçaranduba (*M. huberi*.)

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

A população de *M. huberi* estudada localiza-se em 200 hectares de floresta primária de terra-firme da Amazônia Brasileira, em área da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA Tapajós; 55° 00' W, 2°45'S), na altura do km 83 da BR 163, Rodovia Santarém-Cuiabá, Belterra-PA (Figura 2.1). A área total de estudo compreende 500 ha, entretanto, devido à alta densidade da espécie, a amostragem baseou-se em apenas 200 ha. A FLONA Tapajós consiste numa área de cerca de 600.000 hectares, temperatura média anual de 25°C e umidade relativa de 86% (76-93%). Média de chuva anual de 2110 mm com chuvas intensas entre março e maio e pouca chuva entre agosto e novembro (60 mm) (Carvalho, 1982) *apud* Carvalho (2004). No total, a amostra populacional para os estudos genéticos constituiu-se de 294 árvores com DAP a partir de 10 cm e 810 plântulas descendentes de 27 árvores maternas.

Modelo de simulação

Para a análise de simulação foi definida uma série de parâmetros, dentre eles as informações genéticas obtidas a partir de análises com marcadores moleculares SSR, como frequências alélicas, diversidade genética, índice de fixação, taxa de cruzamento multiloco, além da posição espacial dos indivíduos e DAP. As informações genéticas utilizadas foram baseadas em sete locos na população adulta e seus descendentes as quais foram descritas e discutidas previamente (no Capítulo 2). Outros parâmetros utilizados dizem respeito à taxa de crescimento, densidade e mortalidade, fertilidade, fenologia, polinização e dispersão de semente (Tabela 4.1). Estes parâmetros são fixos e foram mantidos como padrão em todos os cenários, de modo a ter como variável apenas informação sobre manejo, isto é, diferentes formas de exploração. Foram realizadas simulações de 305 anos considerando a primeira

exploração no ano 5. Os cenários de corte variaram quanto a: 1) Ciclo de corte; 2) Intensidade do corte; 3) DAP mínimo de corte (Tabela 4.2). Para cada cenário foram realizadas 100 repetições, e os resultados foram obtidos com base nas médias.

Tabela 4.1 Parâmetros definidos para todos os cenários testados.

Parâmetro	Valores
Crescimento	
Taxa média de crescimento DAP (cm/ano)	0,37
Taxa média de crescimento DAP (cm/ano) DP	0,25
Autocorrelação temporal de crescimento DAP	0,61
Diâmetro máximo (cm)	150
Altura máxima (m)	50
Demografia	
Densidade classe de DAP 0-10 (n/ha)	7,13
Densidade classe de DAP 11-20 (n/ha)	0,81
Densidade classe de DAP 21-30 (n/ha)	0,56
Densidade classe de DAP 31-40 (n/ha)	0,35
Densidade classe de DAP 41-50 (n/ha)	0,34
Densidade classe de DAP 51-60 (n/ha)	0,32
Densidade classe de DAP 61-70 (n/ha)	0,21
Densidade classe de DAP 71-100 (n/ha)	0,57
Densidade classe de DAP 101-150 (n/ha)	0,19
Fenologia	
Porcentagem de adultos florindo - mínimo	25
Porcentagem de adultos florindo - máximo	85
Menor DAP de árvores reprodutivas (cm)	35
Menor DAP de árvores reprodutivas (cm) DP	6,0
Tempo de floração (dias)	10
Tempo de floração (dias) DP	2
Padrão populacional de floração (ano/ano)	2/5
Polinização	
Auto-incompatibilidade - mínima	0,85
Auto-incompatibilidade - máxima	1,0
Distância de vôo do polinizador – máxima (m)	500
Distância de vôo do polinizador – máxima (m) DP	100
Dispersão de sementes	
Proporção de dispersão pela gravidade	0,6
Proporção de dispersão por macacos	0,4
Tamanho médio da semente (cm)	0,5 a 2,0
Distância aleatória de dispersão de sementes (m)	700

DAP= diâmetro a altura do peito; DP = desvio padrão.

As informações ecológicas e fenológicas sobre a espécie foram obtidas de estudos realizados na floresta primária na área de 500 ha na Floresta Nacional do Tapajós pelas equipes de botânica e ecologia do Projeto Dendrogene. As informações genéticas, ecológicas e fenológicas reais obtidas de estudos na floresta primária foram utilizadas como dados de

entrada no programa e formaram a base de dados para a geração de uma população artificial virtual baseada em dados reais. Para as simulações foi gerada uma população ideal de cinco anos, a partir da qual todos os demais cenários foram realizados.

Tamanho populacional. Definiu-se como critério para a geração da população o número mínimo de 500 árvores com DAP a partir de 10 cm. Para *M. huberi*, utilizando como referência a densidade populacional média para as classes de DAP a partir de 10 cm (3,35 ind/ha) obtida dos transectos na FLONA Tapajós, foi criada uma área total de cerca de 150 ha. Esta população artificial serviu como população base para todos os diferentes cenários de dinâmica populacional simulados. Cada ano simulado em cada cenário inclui informações sobre todos os parâmetros descritos na Tabela 4.1 e parâmetros genéticos.

Taxa de crescimento. Formaram a base de dados informações sobre taxa de crescimento em diâmetro e altura. Taxa média de crescimento em diâmetro e seu desvio padrão (DP), autocorrelação temporal e diâmetro máximo influenciam diretamente na modelagem. A relação entre taxa de crescimento (0,37 cm/ano) e o diâmetro (DAP) máximo atingido pela espécie determinam o número de eventos florais e conseqüentemente a sobreposição de gerações, o que é geneticamente importante. A autocorrelação espacial descreve a relação entre as taxas de crescimento anuais. Se a autocorrelação temporal for igual a zero, a taxa de crescimento de sucessivos anos será independente, enquanto que se a taxa for igual a 1 a taxa de crescimento se mantém constante ao longo do tempo. O diâmetro máximo (150 cm) determina quando a árvore morre, buscando uma proximidade com os eventos naturais de mortalidade. A altura máxima (50 m) por sua vez não influencia na simulação.

Densidade e mortalidade. Estes são os dados demográficos referentes à espécie. O Eco-Gene calcula a probabilidade de uma árvore morrer de acordo com a classe diamétrica em que ela se encontra e modifica esta probabilidade a medida que a árvore muda de classe de diâmetro. A densidade por sua vez depende da taxa de mortalidade em cada classe diamétrica. O programa calcula a área basal esperada se baseando em valores tidos como alvo para densidade em todas as classes diamétricas.

Fertilidade e produção de sementes. O modelo simula uma amostragem de sementes produzida a cada evento floral. E é capaz de considerar variação na fertilidade de machos e fêmeas, o que vai variar de acordo com a espécie. Para *M. huberi* que é hermafrodita, foi considerada fertilidade idêntica de machos e fêmeas. Outra variável que o programa contém diz respeito à correlação entre diâmetro e fertilidade que varia de -1 a +1. Correlação que tende +1 implica em relação direta entre intensidade de floração e diâmetro, i.e., maior o diâmetro, maior a intensidade de floração e conseqüentemente maior a fertilidade. Para *M. huberi* considerou-se valor de + 0,8. Para espécies polinizadas por animais, a proporção de autofecundação é controlada por parâmetros de auto-incompatibilidade definidos nos parâmetros que se referem à polinização. Definiu-se 10% como a porcentagem de sobrevivência de sementes oriundas de autofecundação.

Fenologia. Ao nível populacional, definiu-se que a espécie apresenta eventos florais 2 vezes a cada 5 anos, de forma randômica. Ao nível individual o parâmetro mais importante para ser definido para espécies hermafroditas como *M. huberi* é o início e duração da floração da fêmea e do macho, o qual define a sobreposição de gerações e eventos florais entre os indivíduos.

Polinização. O papel do módulo de polinização é determinar os pais de cada semente. Após a inicialização o programa simula vôos de forrageamento que levam à polinização (deposição de pólen ou dispersão sobre a superfície do estigma, mas não necessariamente a polinização em si) até que um número pré-definido de sementes seja produzido. Para espécies hermafroditas ou monóicas a árvore materna e a paterna podem ser a mesma. Para definir os pais da semente, o modelo simula o movimento do polinizador em duas séries de vôos de forrageamento: a primeira série é a partir pontos de início até a árvore que recebe pólen e uma segunda série a partir da árvore que recebe pólen para a árvore onde o pólen de depositado de fato no estigma.

Dispersão de sementes. Sementes podem ser dispersas por oito tipos diferentes de agentes, vento, gravidade, explosão, pequenas aves, grandes aves, morcegos (defecação), morcegos (rotas de alimentação) e macacos. É possível definir a proporção de cada agente na distribuição de sementes de uma determinada espécie. Para *M. huberi* definiu-se que 60% da dispersão é realizada pela gravidade e 40% por macacos. O padrão de dispersão para os oito tipos foi simulado por três funções: a) função negativa exponencial para sementes dispersas pelo vento, pela gravidade e por explosão; b) distribuição randômica com um alcance pré-definido de dispersão de semente por pequenas aves, morcegos (defecação) e macacos; c) função de distribuição agregativa à pontos focais como rotas para morcegos e grande aves.

Manejo florestal. Sistemas alternativos de exploração podem ser selecionados, para *M. huberi* o sistema definido foi o que representa a exploração seletiva regulamentada, i.e., de acordo com DAP. Outros parâmetros que podem ser definidos são: a) ciclos de corte em anos, b) primeiro e último ano de corte, c) DAP mínimo de corte, d) proporção de indivíduos remanescentes que tenham o DAP comercial. Outra série de parâmetros caracteriza a taxa de

mortalidade pós-exploração por DAP. É possível definir esta taxa para três classes. Para *M. huberi* definiu-se que a taxa de mortalidade para árvores de 0-10 cm DAP é de 20%, 11-20 cm, 15% e até 21-45 cm, 10%. O modelo de exploração florestal permitido na Amazônia Brasileira contempla os seguintes parâmetros: DAP mínimo de corte de 45 cm, 10% de remanescentes e ciclos de 30 anos. Este cenário e outros foram simulados, de modo a definir um sistema que seja viável para a sobrevivência da espécie a longo prazo. Os diferentes cenários testados estão listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Informações sobre os diferentes cenários simulados. Para cada cenário foram realizadas 100 repetições e os resultados considerados foram as médias aritméticas obtidas e seus desvios padrões.

Modelo	Tempo total (anos)	DAP (cm)	Ciclo (anos)	Remanescente (%)
População ideal	5	-	-	-
Controle	305	-	-	-
Tempo de recuperação	1000	45	1 corte	10
Exploração padrão	305	45	30	10
<i>Cenários de exploração testados</i>				
I	305	45	30	30
II	305	45	30	50
III	305	45	60	10
IV	305	45	60	30
V	305	45	60	50
VI	305	45	90	10
VII	305	55	60	10
VIII	305	55	30	30
IX	305	55	30	50
X	305	65	30	10
XI	305	65	30	30
XII	305	65	30	50

Genética. São estimados para cada cenário, a cada ano: número total de alelos; número de alelos efetivos; heterozigosidade esperada; heterozigosidade observada; índice de fixação intrapopulacional; distância genética de Gregorius (1978), e número de combinações genotípicas.

RESULTADOS

Em comparação com o controle (simulação de uma floresta de 305 anos sem exploração) foi possível observar impacto em todos os cenários testados, sendo sempre mais intenso no modelo de exploração padrão regulamentado.

Número de indivíduos, área basal e produção de madeira

Em comparação com o cenário controle, todos os cenários mostram perda em relação ao número de indivíduos, sendo mais drástico ao final de 305 anos o cenário padrão, com perda de 34,7% das árvores. Os cenários com menor perda em número de indivíduos foram os que tiveram como limite de corte árvores com DAP a partir de 65 cm, em torno de 10% de perda em relação ao número de indivíduos e entre 41% e 60% de perda em relação à área basal. A perda de 34,7% de indivíduos no cenário padrão de corte representa uma perda de área basal de 80,6%, essa discrepância ocorre por que a taxa de regeneração da espécie é elevada, permanecendo na floresta muitos indivíduos de menor diâmetro, entretanto a perda em área basal é elevada uma vez que os indivíduos retirados pela exploração seletiva são aqueles que possuem DAP muito elevados (até 150 cm).

O cenário que teve por objetivo estimar o tempo de recuperação da floresta após um único corte nos moldes do manejo sustentável florestal mostrou que a espécie *M. huberi* necessita de cerca de 130 anos pra recuperar área basal da floresta primária (Figura 4.2). No cenário de exploração padrão, cujo ciclo de corte é de trinta anos observou-se que o tempo de recuperação da floresta é insuficiente, sendo possível extrair da floresta, a partir do segundo ciclo, entre 18% e 26% do total de madeira extraída no primeiro ciclo. Em todos os cenários com ciclos de corte de 30 anos, o tempo de recuperação da floresta é insuficiente. Apesar de a partir do segundo ciclo a percentagem de madeira retirada da floresta ser de até 80,38% da

retirada no primeiro corte (Tabela 4.3), isso só é observado por que no primeiro corte foi retirada uma quantidade significativamente menor de madeira, permanecendo na floresta 50% das árvores com DAP a partir de 65cm. A quantidade de madeira retirada a partir do segundo ciclo só é elevada para aqueles cenários nos quais pouca madeira pode ser retirada da floresta seja mantendo 30 ou 50% de reserva, seja preservando árvores com DAP até 55 ou 65 cm.

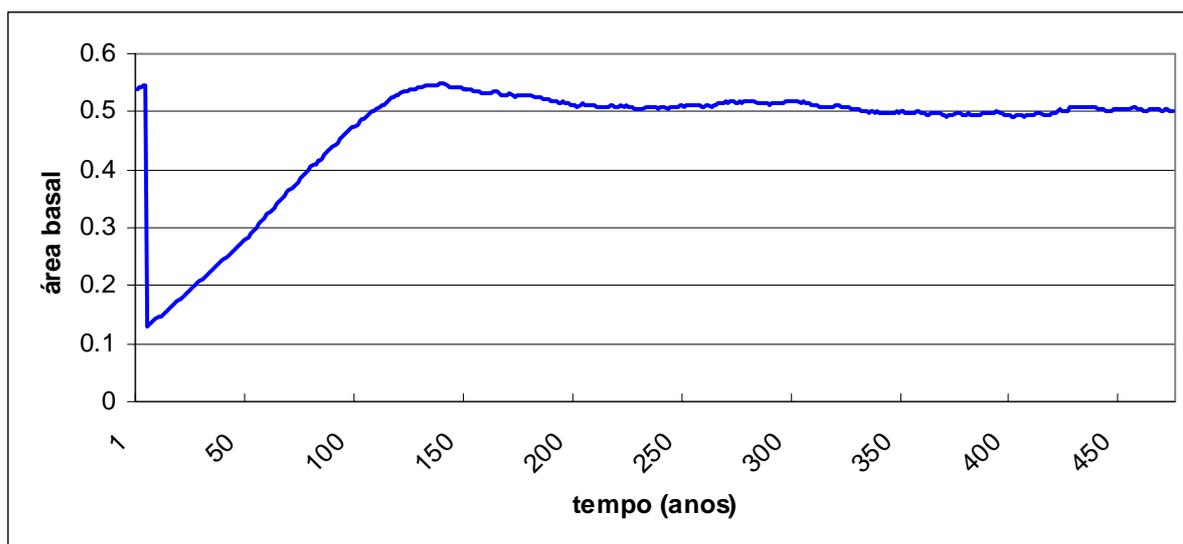


Figura 4.2. Tempo de recuperação da área basal de *M. huberi* após um único corte sob padrões do manejo florestal sustentável regulamentar.

Comparando-se todos os cenários testados, foi observada, ao final de 305 anos, uma diferença de até 30% em relação à quantidade de madeira extraída. O cenário padrão foi o segundo com menor produção, gerando 15,5% menos madeira que o cenário mais produtivo (55cm_60anos_10%). O cenário menor produtivo (45cm_60anos_50%) gerou 24% menos madeira que o mais produtivo ao final de 305 anos. É possível observar que a alteração em apenas um parâmetro (ciclo, DAP ou % de remanescente) não gera alterações significativas, a não ser quando um dos parâmetros é alterado drasticamente, como o cenário testado com ciclos de 90 anos, onde observou-se a possibilidade de maior regeneração da floresta entre os ciclos. Para uma exploração ao mesmo tempo produtiva e de menor impacto é necessário alterar ao menos dois dos três parâmetros. Dentre os três parâmetros testados, o ciclo de corte

foi o que mais gerou alterações no padrão de quantidade de madeira retirada da floresta. Assim, o fator que mais influencia na recuperação da floresta é o intervalo entre cortes sucessivos. Quanto mais tempo a floresta tem para se recuperar, mais madeira ela produzirá, mesmo que tenham permanecido na floresta poucos indivíduos na fase reprodutiva.

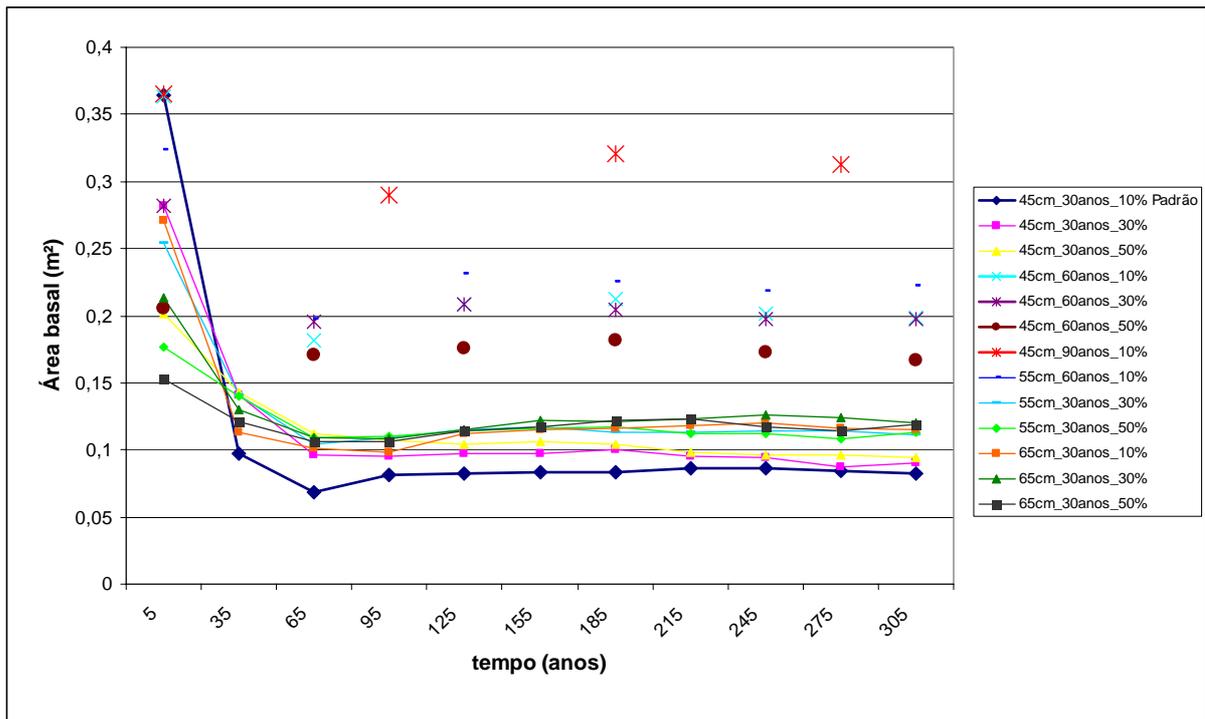


Figura 4.3. Quantidade de madeira retirada da floresta em cada ciclo em cada cenário testado.

Impacto na variabilidade genética

As estimativas dos índices genéticos clássicos, como H_e , H_o e f não apresentaram grandes variações. Isto pode ter ocorrido devido à quantidade de indivíduos remanescentes na floresta, o que é grande o suficiente para que essas estimativas não sejam alteradas significativamente com a exploração. Indicando que apesar de intensa em relação à quantidade de madeira retirada da floresta a exploração não foi capaz de influenciar significativamente nessas estimativas. Isto também demonstra que estes índices são pouco sensíveis para medir os efeitos da exploração. Entretanto é possível observar uma perda de

1,67% (2 alelos) a 7,25% (8 alelos) de número total de alelos entre os cenários de exploração e o controle, e perda de 0,8 a 7% de alelos efetivos o que corresponde a uma média de 0,5 a 1 alelo, indicando que a maior perda é de alelos raros. Em relação às combinações genotípicas, é possível observar grande perda, especialmente naqueles cenários onde houve maior perda de alelos, sendo este fator o mais alterado pela exploração seletiva utilizada na prática. A distância genética entre a população inicial e após 305 anos aumenta em todos os cenários com exploração em relação ao controle (Tabela 4.4). O cenário de exploração padrão foi o que apresentou maior distância genética em relação à população inicial, sendo esta distância 52% maior em relação à distância genética observada no cenário padrão (sem corte). Por outro lado, o cenário que apresentou distância genética menor em relação ao cenário padrão (12%) foi o que realiza corte seletivo a partir de 65cm de DAP em ciclos de corte de 30 anos e deixa 50% de árvores remanescentes na floresta.

As combinações genotípicas possuem relação direta com o número de alelos, sendo, portanto mais afetadas nos cenários em que a população apresenta menor perda do número total de alelos.

Tabela 4.3. Quantidade de madeira retirada da floresta medida em área basal (m²/ha) acumulativa. Ao final está representada a quantidade total de madeira retirada da floresta após 305 anos de exploração. A percentagem representa quanto de madeira é retirado da floresta em relação ao primeiro corte realizado (05 anos).

	05 anos	35 anos	65 anos	95 anos	125 anos	155 anos	185 anos	215 anos	245 anos	275 anos	305 anos
Padrão	0,3638	0,4611	0,5294	0,6108	0,6928	0,7766	0,8604	0,9464	1,0324	1,1168	1,1987
	(100%)	(26,7%)	(18,8%)	(22,4%)	(22,5%)	(23,0%)	(23,0%)	(23,6%)	(23,6%)	(23,2%)	(22,5%)
	0,2824	0,4228	0,5186	0,6144	0,7113	0,8085	0,9088	1,0043	1,0986	1,1856	1,2756
45cm_30anos_30%	(100%)	(49,7%)	(33,9%)	(33,9%)	(34,3%)	(34,4%)	(35,5%)	(33,8%)	(33,4%)	(30,8%)	(31,8%)
	0,2017	0,3443	0,4565	0,5634	0,6673	0,7730	0,8768	0,9755	1,0717	1,1681	1,2625
45cm_30anos_50%	(100%)	(70,7%)	(55,6%)	(53,0%)	(51,5%)	(52,4%)	(51,4%)	(49,0%)	(47,7%)	(47,8%)	(46,8%)
	0,3634		0,5454		0,7536		0,9661		1,1680		1,3664
45cm_60anos_10%	(100%)	-	(50,1%)	-	(57,3%)	-	(58,5%)	-	(55,6%)	-	(54,6%)
	0,2822		0,4778		0,6860		0,8902		1,0879		1,2852
45cm_60anos_30%	(100%)	-	(69,4%)	-	(73,7%)	-	(72,3%)	-	(70,1%)	-	(69,9%)
	0,2059		0,3768		0,5526		0,7342		0,9064		1,0728
45cm_60anos_50%	(100%)	-	(83,0%)	-	(85,3%)	-	(88,2%)	-	(83,7%)	-	(80,8%)
	0,3651			0,6550			0,9758			1,2885	
45cm_90anos_10%	(100%)	-	-	(79,4%)	-	-	(87,9%)	-	-	(85,7%)	-
	0,3234		0,5214		0,7530		0,9780		1,1966		1,4190
55cm_60anos_10%	(100%)	-	(61,2%)	-	(71,6%)	-	(69,6%)	-	(67,6%)	-	(68,8%)
	0,2539	0,3952	0,4995	0,6082	0,7233	0,8406	0,9539	1,0672	1,1812	1,2951	1,4059
55cm_30anos_30%	(100%)	(55,7%)	(41,1%)	(42,8%)	(45,4%)	(46,2%)	(44,6%)	(44,6%)	(44,9%)	(44,9%)	(43,6%)
	0,1768	0,3171	0,4266	0,5371	0,6511	0,76678	0,8840	0,9961	1,1085	1,2171	1,3304
55cm_30anos_50%	(100%)	(79,4%)	(62,0%)	(62,5%)	(64,5%)	(65,4%)	(66,3%)	(63,4%)	(63,6%)	(61,5%)	(64,1%)
	0,2709	0,3837	0,4846	0,5828	0,6948	0,8101	0,9265	1,0442	1,1643	1,2800	1,3955
65cm_30anos_10%	(100%)	(41,6%)	(37,2%)	(36,2%)	(41,3%)	(42,6%)	(43,0%)	(43,4%)	(44,3%)	(42,7%)	(42,6%)
	0,2129	0,3428	0,4524	0,5602	0,6755	0,7971	0,9179	1,0407	1,1664	1,2908	1,4110
65cm_30anos_30%	(100%)	(61,0%)	(51,4%)	(50,6%)	(54,2%)	(57,1%)	(56,7%)	(57,7%)	(59,0%)	(58,5%)	(56,4%)
	0,1531	0,2739	0,3802	0,4864	0,6005	0,7173	0,8397	0,9627	1,0803	1,1941	1,3136
65cm_30anos_50%	(100%)	(79,0%)	(69,4%)	(69,4%)	(74,5%)	(76,3%)	(80,0%)	(80,4%)	(76,8%)	(74,4%)	(78,0%)

Tabela 4.4. Dados sobre características genéticas após simulações de 305 anos em cada cenário.

Cenários	n	A	A_e	H_e	H_o	f	D	NG
Controle	1707 ± 45,6	115,51 ± 2,41	6,61 ± 0,25	0,848 ± 0,006	0,594 ± 0,017	0,300 ± 0,019	0,125 ± 0,001	634,77 ± 19,34
45cm_30anos_10% Padrão	1108 ± 45,0	107,13 ± 2,98	6,17 ± 0,40	0,837 ± 0,011	0,569 ± 0,021	0,320 ± 0,023	0,191 ± 0,003	522,64 ± 27,73
45cm_30anos_30%	1211 ± 33,2	107,32 ± 3,21	6,15 ± 0,35	0,837 ± 0,010	0,567 ± 0,022	0,323 ± 0,024	0,187 ± 0,003	530,12 ± 27,10
45cm_30anos_50%	1375 ± 105,1	107,87 ± 2,93	6,32 ± 0,36	0,841 ± 0,009	0,573 ± 0,022	0,319 ± 0,023	0,171 ± 0,002	551,02 ± 24,40
45cm_60anos_10%	1341 ± 34,0	110,32 ± 2,67	6,42 ± 0,33	0,844 ± 0,008	0,584 ± 0,017	0,308 ± 0,019	0,161 ± 0,006	580,20 ± 22,14
45cm_60anos_30%	1365 ± 38,4	110,67 ± 2,61	6,44 ± 0,32	0,844 ± 0,008	0,584 ± 0,017	0,308 ± 0,019	0,152 ± 0,001	585,41 ± 22,92
45cm_60anos_50%	1373 ± 31,8	111,69 ± 2,71	6,48 ± 0,31	0,845 ± 0,008	0,585 ± 0,019	0,308 ± 0,022	0,145 ± 0,001	592,40 ± 25,97
45cm_90anos_10%	1240 ± 59,5	112,46 ± 2,70	6,38 ± 0,35	0,843 ± 0,009	0,587 ± 0,019	0,303 ± 0,020	0,154 ± 0,004	579,74 ± 25,52
55cm_60anos_10%	1220 ± 32,6	110,89 ± 2,82	6,51 ± 0,30	0,846 ± 0,007	0,586 ± 0,017	0,308 ± 0,019	0,152 ± 0,001	580,77 ± 23,99
55cm_30anos_30%	1333 ± 31,1	109,75 ± 3,22	6,43 ± 0,30	0,844 ± 0,007	0,580 ± 0,018	0,312 ± 0,020	0,158 ± 0,001	569,94 ± 26,37
55cm_30anos_50%	1234 ± 48,3	110,91 ± 3,05	6,44 ± 0,34	0,844 ± 0,008	0,584 ± 0,016	0,308 ± 0,018	0,155 ± 0,002	570,87 ± 25,21
65cm_30anos_10%	1525 ± 84,8	111,51 ± 2,88	6,52 ± 0,30	0,846 ± 0,007	0,587 ± 0,014	0,306 ± 0,016	0,150 ± 0,001	597,13 ± 22,48
65cm_30anos_30%	1556 ± 49,9	112,02 ± 2,92	6,56 ± 0,31	0,847 ± 0,007	0,581 ± 0,017	0,314 ± 0,019	0,147 ± 0,001	603,40 ± 24,90
65cm_30anos_50%	1511 ± 82,1	113,58 ± 2,82	6,61 ± 0,30	0,848 ± 0,007	0,591 ± 0,018	0,303 ± 0,020	0,140 ± 0,001	613,39 ± 23,94

n , número de indivíduos; A , número de alelos, A_e , alelos efetivos; H_e , heterozigosidade esperada; H_o , heterozigosidade observada; f , índice de fixação de alelos na população; D , distância genética de Gregorius (1978) e NG , número de combinações genotípicas.

DISCUSSÃO

A exploração cuidadosa consiste em fazer um inventário das árvores comerciais com $DAP \geq 45$ cm antes da exploração, o que permitiria ao grupo de exploração saber a localização, não somente das árvores para este corte, mas também a localização das potenciais árvores madeireiras para a próxima extração. Cortar os cipós um ou dois anos antes da exploração, para que as conexões entre as árvores estejam enfraquecidas quando as árvores comerciais forem derrubadas, causando menor dano durante a queda. Empregar uma equipe de planejamento para decidir em que direção cada árvore deve ser derrubada (dentro do limite do que é possível) para que possam ser planejadas uma rede de estradas, pátios e trilhas de arraste eficientes antes da exploração, o que, por sua vez, permitirá evitar danos (Johns, 1998).

Para isso, é necessário o treinamento de todas as equipes de trabalho nos métodos de exploração de baixo impacto, para que as atividades possam ser realizadas efetivamente. E, finalmente, explorar cuidadosamente também significa assegurar-se de que as populações de espécies comerciais não estão sendo levadas à extinção local, e isto significa deixar no local algumas das melhores árvores como matrizes, o que dificilmente as empresas madeireiras fazem.

Barreto *et al.* (1998), usando dados de três locais na região de Paragominas, simularam o volume de madeira disponível em um ciclo de corte de 30 anos. Para isso, consideraram a utilização de técnicas de manejo florestal, as quais reduziram em 30% os danos às árvores, além do uso de tratamentos silviculturais após a extração. Foi estimado que o volume disponível no segundo corte (após 30 anos) seria similar ao volume extraído no primeiro (38 m³/ha). Ao contrário, sem o manejo (exploração sem planejamento e sem tratamento silvicultural após a extração), o volume disponível para o segundo corte seria apenas 17

m³/ha, isso é 66% menor. Cerca de 80% desta diferença na produção entre a exploração planejada e a sem planejamento foi devido à redução no número de árvores danificadas durante a exploração, e 16% teve como causa as taxas maiores de crescimento pelo uso de tratamentos silviculturais. Portanto, Barreto *et al.* (1998) argumentam que a redução dos danos durante a exploração é o componente mais importante dos programas de manejo florestal. Entretanto, estes estudos se basearam apenas em dados demográficos, enquanto que o fator genético, responsável pelas diferenças em produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos de uma mesma espécie não tem sido considerado nos programas de manejo de florestas tropicais (Sebbenn *et al.*, 2000a). Neste sentido os dados de Barreto *et al.* (1998) podem ter sido superestimados. De fato, estudo publicado em 1998 por Chambers *et al.*, o qual buscou por meio da análise do ¹⁴C determinar as idades das árvores amazônicas, revela que trata-se de anciãs e que a *M. huberi* e.g. necessita de mais de 400 anos para atingir o DAP equivalente a 160cm.

Todos os parâmetros utilizados no modelo de simulação Eco-Gene são baseados em dados reais obtidos de estudos ecológicos, botânicos, fenológicos e genéticos da espécie *M. huberi* realizados no âmbito do Projeto Dendrogene na região da Floresta Nacional do Tapajós em Belterra, PA. Em virtude disso e da grande quantidade de parâmetros considerados para a realização das simulações, acredita-se que os resultados obtidos sejam bastante robustos.

As simulações de cenários de exploração permitiram quantificar o impacto na estrutura genética populacional, bem como na demografia da espécie. A simulação de uma floresta com apenas um corte, seguindo os moldes no manejo florestal regulamentado mostrou que ciclos de 30 anos como proposto por Barreto *et al.* (1998), e adotado pelo governo como regra, são inviáveis, uma vez que a floresta está ainda em processo de recuperação, alcançando área basal equivalente à da floresta primária apenas 130 anos após o primeiro

corte (Figura 4.1). Os resultados aqui apresentados não dão suporte às recomendações atuais. Em simulações com *Bagassa guianensis*, uma espécie dióica, pioneira, observou-se que após o primeiro corte a espécie demora 200 anos pra recuperar 80% da área basal que ocupava na floresta primária (Silva comunicação pessoal; Pivetta, 2005) o que indica a ocorrência de diferentes níveis de impactos para as espécies e seu período de reposição da área basal. Corroborando, portanto, com a idéia de informações e entendimento ecológicos e/ou genéticos em níveis espécies ou mesmo grupos de espécies que são imprescindíveis para uma complexidade florestal como a observada em nossas florestas tropicais úmidas.

Buchert *et al.* (1996) detectaram que o corte de 75% das árvores de *Pinus strobus* causa uma redução de 25% no número total de alelos, e redução de 40% de alelos raros. Em *M. huberi* as perdas em relação ao número de alelos não foram tão elevadas, entretanto significativas, apresentando, o cenário padrão, maior perda de alelos (7,25%). De modo geral, o impacto imediato da exploração se dá diretamente no número de indivíduos, especialmente os reprodutivos, o que causa redução da base genética das futuras gerações devido à redução de número de alelos e genótipos. Em *M. huberi*, no entanto, foi observado maior impacto na área basal e não no número de indivíduos, o que pode estar diretamente associado à alta taxa de regeneração da espécie. Alelos de baixa frequência são mais sensíveis à efeito “gargalo” e deriva genética e a perda de alelos está diretamente ligada ao tamanho populacional (Nei, 1975). Outro fator que contribui para a menor perda de alelos é o fato de a espécie necessitar de aproximadamente 432 anos para atingir o DAP máximo e morrer. Assim, a população simulada de 305 anos ainda retém árvores que tinham o DAP de 47 cm e já eram reprodutivas no ano um.

Diversos estudos detectaram efeito de exploração na base genética de espécies arbóreas. Sebbenn *et al.* (2000a) em estudos com *Tabebuia cassinoides* observaram perda de

alelos e redução das heterozigosidades esperadas e observadas, e conseqüente aumento do índice de fixação em populações exploradas.

Em relação ao custo benefício, a exploração padrão a partir do segundo ciclo não é mais vantajosa, uma vez que pouco poderá ser retirado da floresta. Cenários como o que se baseia em ciclos de 90 anos ou os que se baseiam em ciclos de 60 anos são mais interessantes no sentido de quantidade de madeira retirada por exploração e ao mesmo tempo são os que geram menor impacto na estrutura genética populacional, pois permitem uma recuperação mais consistente da espécie, e devido a isso são cenários mais recomendados, embora não garantam a sustentabilidade. Os demais cenários, que se referem à permanência na floresta de 30 ou 50% das árvores de interesse comercial são desvantajosos para a madeireira, no sentido de quantidade de madeira retirada por ciclo, o que pode tornar o custo do processo elevado para pouco produto. Geneticamente são impactantes, e só seriam interessantes para a espécie se estivessem associadas a explorações mais restritas, como árvores com DAP a partir de 65 cm. É interessante observar que de modo geral, em todos os cenários, quantidade semelhante de madeira é retirada ao final de 305 anos de exploração, sendo o cenário padrão aplicado na floresta atualmente o mais desvantajoso a longo prazo sob este aspecto.

É possível afirmar que dentre os cenários testados, dois são menos impactantes e ao mesmo tempo permitem a extração de quantidade de madeira maior que a produzida pela exploração padrão ao final de 305 anos. São eles: 45cm_90anos_10% e 65cm_30anos_50%.

Infelizmente o alcance da visão comercial é restrito, não estando os empreendedores interessados no que pode ocorrer com a floresta a longo prazo, não sendo interessante ciclos que podem durar mais que suas próprias vidas. Portanto, se não houver uma dura discussão neste contexto, dificilmente haverá possibilidades de mudança, o que permitirá que somente a uma próxima geração se beneficie dessas florestas caso alguma mudança na legislação não

venha a ocorrer. Neste sentido, apesar da pressão sofrida pelo governo por parte dos interessados na retirada de madeira da floresta, uma atitude definitiva deve ser tomada, e um manejo florestal que seja de fato sustentável deve ser aplicado. A exploração madeireira aplicada na Guiana Francesa é exemplo de cenário de exploração mais moderado onde é permitido cortar árvores com DAP a partir de 60 cm em ciclos de corte de 65 anos. Ainda assim, Sebbenn *et al.* (2007, submetido) ao estudarem quatro espécies madeireiras (*B. guianensis*, *H. courbaril*, *M. huberi* e *S. globulifera*) por meio da simulação de cenários detectaram que mesmo o cenário aplicado na Guiana Francesa é insustentável para três destas espécies, sendo aceitável apenas para a *S. globulifera*.

Cuidado com o meio ambiente só será de interesse primordial a partir do momento em que a comunidade tiver consciência do que está sendo feito e das conseqüências com as quais terá que arcar. Somente a geração de conhecimentos cada vez mais específicos poderá dar suporte à decisões mais sustentáveis e aplicáveis à regulamentação da exploração que contenham também o componente de conservação genética que visem a continuidade da floresta. Caso contrário, em pouco tempo, não haverá providência capaz de impedir a exaustão de nossas florestas tropicais.

O modelo de exploração regulamentado no Brasil não é sustentável para a espécie aqui discutida, assim como reportado por Gayot & Sist (2004); Schulze *et al.* (2005); van Gardingen (2006) e Valle *et al.* (2006) e ainda assim é responsável por uma pequena parte dos planos de manejo em execução. A exploração predatória ainda responde pela maior parte da exploração madeireira no Brasil, e neste sentido, em pouco tempo a recuperação da floresta Amazônica será inviável. Espera-se que os resultados de modelagem de diferentes cenários auxiliem nas discussões e nos avanços sobre boas práticas de manejo florestal com aplicações principalmente para a revisão de normas e regulamentos legais.

Vale ressaltar que a modelagem é um indicativo do cenário futuro na Amazônia Brasileira, entretanto, devido à variáveis cujo controle foge às mãos dos homens, não deve ser considerada como capaz de fornecer resultados absolutos e precisos a respeito do futuro da floresta, mas deve ser considerada como um indicativo de que o caminho adotado não é eficiente para a manutenção da floresta a longo prazo. A importância da utilização deste tipo de ferramenta está no fato de ser possível realizar previsões a longo prazo, i.e., centenas de anos, estudos esses impossíveis de serem conduzidos de forma real, para impedir um grande desastre na natureza.

CONCLUSÃO

O manejo florestal aplicado atualmente na Amazônia Brasileira não garante, à luz das informações disponíveis, o potencial evolutivo das espécies comercialmente exploradas. Isto decorre, basicamente, devido ao fato dos planos de manejo não considerarem as diferenças existentes entre as espécies, o que faz com que, para algumas delas, o manejo seja extremamente nocivo. Uma fragilidade à sustentabilidade dos planos de manejo consiste no fato de as recomendações serem definidas com base apenas em dados dendrométricos. Vale reconhecer que a geração de informações biológicas são de natureza mais lenta e às vezes laboriosa. Contudo, a medida que essas informações são disponibilizadas, elas deveriam fazer parte do conjunto de informações utilizadas para garantir cada vez mais a sustentabilidade dos planos de manejo florestal.

Progressos vêm ocorrendo de modo a garantir a sustentabilidade dos planos de manejo. Recentemente, houve a aprovação da instrução normativa N° 05 de 11 de dezembro de 2006 (MMA), alterando o diâmetro mínimo de corte das árvores madeireiras amazônicas, elevando esse limite de 45 cm para 50 cm. Apesar de a alternativa ser mais conservadora, não é ainda suficiente para garantir a sustentabilidade florestal. Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam a necessidade de se repensar no modelo de exploração seletiva de modo a alcançar um patamar de sustentabilidade.

Apesar de *M. huberi* ser uma espécie clímax, com alta taxa de regeneração, ela sofre forte impacto com a exploração madeireira atual. A necessidade de aplicação de ciclos de corte com intervalos maiores é evidente e talvez seja a alternativa mais eficiente para permitir a recuperação da área basal. Neste sentido, o cenário de corte com ciclos de 90 anos, 10% de remanescentes com DAP a partir de 45 cm é o recomendado dentre os testados, sendo o mais sustentável e com melhor custo benefício. Apesar de os índices clássicos obtidos em estudos

de genética de populações não terem sido alterados significativamente, o que é explicado pela intensa regeneração da espécie, o que faz com que muitos indivíduos com DAP abaixo do comercial permaneçam na floresta, a perda de alelos raros é marcante e a distância genética entre a população atual e a população explorada após 305 anos é significativa e preocupante. Outro fator relacionado à não alteração destes índices genéticos diz respeito ao fato de a alta variação alélica em locos SSR serem capazes mascarar importantes perdas em heterozigosidade e conseqüentemente o efeito da fragmentação e exploração seletiva, sendo necessário realizar simulações mais longas. Como a espécie tem vida longa, ao final de 305 árvores que eram reprodutivas no ano um (até 47cm de DAP), ainda estão vivas e reproduzindo. Simulações mais longas, que atingissem o ponto de excluir da população todos os indivíduos presentes no ano um, poderiam ser capazes de detectar perdas alélicas e variações de heterozigosidade e índice de fixação mais significativas.

Estudos desta natureza e outros em níveis específicos ou mesmo em níveis de grupos ecológicos e genéticos (e.g., García-Fernández *et al.*, 2007; Gayot & Sist, 2004; Schulze *et al.*, 2005; Sebbenn *et al.*, 2007 submetido; Putz, 2005; Valle *et al.*, 2006; vanGardingen *et al.*, 2006) reforçam o pensamento mais recente da necessidade de rever as recomendações dos planos de manejo florestal, onde não apenas façam parte da equação da sustentabilidade, os produtos madeireiros mas também os não-madeireiros, e não apenas os valores dendrométicos, mas também os ecológicos e genéticos. Em nosso entendimento esta seria a maneira adequada para olhar de forma sistematizada um ecossistema como a floresta tropical úmida. Somente assim, a possibilidade tanto de evolução quanto de adaptação das espécies e da floresta estariam sendo resguardadas, assim como a possibilidade de futuras gerações se beneficiarem deste bem comum, tendo como resultado um longo processo evolutivo e adaptativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASNER, G.P.; KNAPP, D.E.; BROADBENT, E.N.; OLIVEIRA, P.J.C.; KELLER, M.; SILVA, J.N. Selective logging in the Brazilian Amazon. **Science**, v. 310, p. 480-482, 2005.
- AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P.E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between pollen dispersal and interfemale distance. **Genetics**, v. 157, p. 851-857, 2001.
- AZEVEDO, V.C.R.; VINSON, C.C.; CIAMPI, A.Y. Twelve microsatellite loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian timber species. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 13-15, 2005.
- BARRETO, P.; AMARAL, P.; VIDAL, E.; UHL, C. Costs and benefits of forest management in eastern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 108, n. 1-2, p. 9-26, 1998.
- BECKMANN, J.S.; WEBER, J.L. 1992. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, 12:627-631.
- BOSHIER, D.H.; Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae) in French Guiana. **Heredity**, v. 9, p. 72-82, 1995.
- BOTTIN, L.; VERHAEGEN, D.; TASSIN, J.; OLIVIERI, I.; VAILLANT, A.; BOUVET, J.M. Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1979-1989, 2005.
- BRAGA, P.I.S. Subdivisão fitogeográfica, tipos de vegetação, conservação e inventário florístico da Floresta Amazônica. **Acta Amazônica**, v. 9, n. 4, p. 53-80, 1979.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GATTRAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus gaudii* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.
- BRONDANI, R.P.V.; GATTRAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, v. 31, n. 4, p. 793-795, 798, 800, 2001.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, v. 134, p. 59-71, 2001.
- BUCHERT, G.P.; RAJORA, O.P.; HOOD, J.V. Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine in Ontario, Canada. **Conservation Biology**, v. 11, p. 747-758, 1997.
- BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of South America wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 107-117, 1998.
- BUSO, G.S.C.; BRONDANI, R.V.; AMARAL, Z.P.S.; REIS, A.M.M.; FERREIRA, M.E. Desenvolvimento de *primers* SSR para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum spp.*) utilizando biblioteca genômica enriquecida. Boletim Técnico EMBRAPA/EPAGI, Brasília DF, 2000. 27p.

- BUSO, G.S.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.P.V.; MORETZSOHN, M.C.; BRONDANI, C.; FERREIRA, M.E. Development and characterization of simple repeat markers for *Phaseolus vulgaris*. In: 47º Congresso Nacional de Genética. Sociedade Brasileira de Genética, Anais. Águas de Lindóia, SP, 2001.
- BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; SOUZA, Z.P. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Circular técnica 20, Embrapa Cenargen, Brasília DF, 2003.11p.
- BYRNE, M.; MORAN, G.F.; TIBBITS, W.N. Restriction map and maternal inheritance of chloroplast DNA in *Eucalyptus nitens*. **Journal of Heredity**, v. 84, p. 218-220, 1993.
- CAETANO-ANÓLLES, G.; BASSAM, B.G.; GRESSHOFF, P.M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, v. 9, p. 553-557, 1991.
- CARDOSO, S.R.S.; ELOY, N.B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, P.C.G. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1753-1760, 2000.
- CARON, H.; DUMAS, S.; MARQUE, G.; MESSIER, C.; BANDO, E.; PETIT, R.J.; KREMER, A. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1089-1098, 2000.
- CARVALHO, J.O.P.; SILVA, J.N.M.; LOPES, J.C.A. Growth rate of a terra firme rain forest in brazilian amazonia over an eight-year period in response to logging. **Acta Amazonica**, v. 34, n.2, p. 209-217, 2004.
- CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J.J.; FUCHS, E.A. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology**, v. 16, p. 137-147, 2002.
- CERQUEIRA, A.A.; AZEVEDO, V.C.R.; SOUZA, Z.P.; BUSO, G.S.C. Desenvolvimento de marcadores de regiões repetitivas (SSRs) para análise genética de feijão. In: 50º Congresso Nacional de Genética. Sociedade Brasileira de Genética, Anais. Florianópolis, SC. 2004.
- CHAMBERS, J.Q.; HIGUCHI, N.; SCHIMEL, J.P. Ancient trees in Amazonia. **Nature**, v. 391, p. 135-136, 1998.
- CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. 2000. Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites para *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Copaíba)-Leguminosae-Caesalpinioideae e Otimização de Sistemas Fluorescentes de Genotipagem Multiloco. Boletim de Pesquisa 16, Embrapa Cenargen, Brasília DF, 2000. 40p.
- CIAMPI, A.Y.; MAGALHÃES, M.T.Q. Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD. Comunicado Técnico 60, Embrapa Cenargen, Brasília DF, 2001, 8p.
- CIAMPI, A.Y.; AZEVEDO, V.C.R.; SILVA, V.P. 2003. Análise genética populacional de *Tabebuia impetiginosa* utilizando marcadores moleculares RAPD. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento, 55. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília DF, 2003. 18p.
- CLOUTIER, D.; PÓVOA, J.S.R.; PROCÓPIO, L.C.; LEÃO, N.V.M.; WADT, L.H. de O; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. **Silvae Genetica**, v. 54, n. 6, p. 257-300, 2005.

- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v. 23, p. 72-84, 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**, v. 83, p. 748-756, 1999.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, and endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, p. 60-67, 2001.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 105-115, 2003.
- DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504-509, 2004.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, J.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1585-1592, 1999.
- DEGEN, B.; GREGORIUS, H.R.; SCHOLZ, F. Eco-Gene, a model for simulation studies on the spatial and temporal dynamics of genetic structures of tree populations. **Silvae Genetica**, v. 45, p. 323-329, 1996.
- DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS—Spatial Genetic Software: A Computer Program for Analysis of Spatial Genetic and Phenotypic Structures of Individuals and Populations. **The Journal of Heredity**, v. 92, n.5, p. 447-449, 2001.
- DEGEN, B.; ROUBIK, D.; LOVELESS, M.D. Impact of selective logging and forest fragmentation on the seed cohorts of an insect-pollinated tree: a simulation study. In: DEGEN, B.; LOVELESS, M.D.; KREMER, A. (Eds.), Modeling and Experimental Research on Genetic Process in Tropical and Temperate Forest. EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém, Brasil. p. 108-110, 2002.
- DEGEN, B. Spatial Genetic Software (SGS), version 1.0d, 2003. Disponível em: <<http://korov.cirad.fr/genetique>>. Acesso em: 10 de dez. 2006.
- DEGEN, B.; WATSON, L.O. 2004. Users' manual for Eco-Gene version 4.1. Disponível em: <http://ghd.dnalias.net/degen/manual_Eco_Gene_4_1.pdf> Acesso em: 6 de ago. 2006.
- DEGEN, B.; BLANC, L.; CARON, H.; MAGGIA, L.; KREMER, A.; GOURLET-FLEURY, S. Impact of selective logging on genetic composition and demographic structure of four tropical tree species. **Biological Conservation**, v. 131, p. 386-401, 2006.
- DENDROGENE. Maçaranduba, / *Manilkara huberi* /. Belém PA: Embrapa Amazônia Oriental: Projeto Dendrogene, 2004. (Projeto Dendrogene. Espécies Arbóreas da Amazônia, 4).
- DICK, C.W. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences, v. 268, p. 2391-2396, 2001.
- DICK, C.W.; ETCHOLECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and Africa honeybees in pristine and fragmentef Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 753-764, 2003.

- DINIZ-FILHO, J.A.F.; TELLES, M.P.C. Spatial Autocorrelation Analysis and the Identification of Operational Units for Conservation in Continuous Populations. **Conservation Biology**, v. 16, n. 4, p. 924-935, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.
- DYER, R.J.; SORK, V.L. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 859-866, 2001.
- EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 746-756, 1991.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.
- EMBRAPA. Diagnóstico dos projetos de manejo florestal no Estado do Pará – Fase Paragominas. Relatório Preliminar. Embrapa/Cpatu, 1996. Belém-Pará.
- ENNOS, R.A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, v. 72, p. 250-259, 1994.
- ERICKSON, D.L.; HAMRICK, J.L.; KOCHERT, G.D. Ecological determinants of genetic diversity in an expanding population of the shrub *Myrica cerifera*. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1655-1664, 2004.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.W. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.
- FERRAZ, I.D.K.; LEAL-FILHO, N.; IMAKAWA, A.M.; VARELA, V.P.; PINA-RODRIGUES, F.C.M. Características básicas para um agrupamento ecológico preliminar de espécies madeireiras da floresta de terra firme da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 4, p. 621-633, 2004.
- FUTUYMA, D.J. *Biologia Evolutiva*. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1993, 631p.
- GAGNEUX, P.; BOESCH C.; WOODRUFF, D.S. Microsatellite scoring errors associated with nonvasive genotyping base don nuclear DNA amplified from shed hair. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 861-868, 1997.
- GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R.P.V. Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology**, v. 1, n. 1-2, p. 86-92, 2000.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, C.; SIST, P.; KANASHIRO, M. Manejo sostenible do los bosques tropicales: desafío para las prácticas de aprovechamiento de impacto reducido. **Recursos Naturales y Ambiente**, v. 49, p. 12-17, 2007.
- GAYOT, M.; SIST, P. Vulnerability of maçaranduba species to logging in the Brazilian Amazon: the need for new logging standards. **Bois et forest des tropiques**, v. 280, n. 25, p. 75-89 2004.
- GOLDSTEIN, B.D.; SCHLOTTERED, C. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, 2001, 352p.

- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. **Genetics**, v. 144, p. 1205-1214, 1996.
- GREGORIUS, H.R. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. **Mathematical Bioscience**, n. 41, p. 253-271.
- HAIIG, S.M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v. 79, p. 413-425, 1998.
- HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeat element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 6465-6469, 1982.
- HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A.; NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, v. 107/108, p. 281-297, 1993.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618-620, 2002.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI 1.1. A program for spatial pattern analysis of genetic diversity. 2003. Version for Windows 95.
- HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDOU, E.; BREYNE, P.; CARON, H.; CHEVALLIER, M.H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 559-571, 2006.
- HARRIS, S.A.; INGRAM, R. Chloroplast DNA and biosystematics: the effect of intraspecific diversity and plastid transmission. **Taxon**, v. 40, p. 393-412, 1991.
- HEDRICK, P.W. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, n. 2, p. 313-318, 1999.
- IRWIN, A.L.; HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SMOUSE, P.E. A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibrissin*. **Heredity**, v. 90, p. 187-194, 2003.
- JACOB, H.J.; LINDPAINNER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.P.; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v. 67, p. 213-224, 1991.
- JOHNS, J.S.; BARRETO, P.; UHL, C. Os Danos da Exploração de Madeira Com e Sem Planejamento na Amazônia Oriental Série Amazônia N° 16, 1998. Belém: Imazon, 42 p.
- KAGEYAMA, P.; GANDARA, F.B.; VENCOVSKY, R. Conservação *in situ* de espécies tropicais. In: Recursos genéticos e melhoramento – plantas, 2002. Rondonópolis: Fundação MT, 1183p.
- KANASHIRO, M.; THOMPSON, I.S.; YARED, J.A.G.; LOVELESS, M.D.; COVENTRY, P.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; DEGEN, B.; AMARAL, W. Improving conservation values of managed forests: The Dendrogene Project in the Brazilian Amazon. **Unasylva** v. 209, 2001.

- KASHI, Y.; TIKOCHINSKY, Y.; IRAQI, F.; BECKMANN, J.S.; GRUENBAUM, Y.; SOLLER, M. Large DNA fragments containing poli(TG) are highly polymorphic in a variety of vertebrates. **Nucleic Acid Research**, v. 18, p. 1129-1132, 1990.
- KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple Sequence Repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics**, v. 13, p. 74-78, 1997.
- KELLER, L.F.; WALLER, D.M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 17, p. 230-241, 2002.
- KING, D.G. Triple repeat DNA as a highly mutable regulatory system. **Science**, v. 263, p. 595-596, 1994.
- KONUMA, A.; TSUMURA, Y.; LEE, C.T.; LEE, S.L. Estimation of gene flow in the tropical-reinforest tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 859-866, 2000.
- KÜNZLER, P.; MATSUO, K.; SCHAFFNER, W. Pathological, physiological and evolutionary aspects of short unstable DNA repeats in the human genome. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**, v. 376, p. 201-211, 1995.
- KWOK, S.; KELLOGG, D.E.; MCKINNEY, N.; SPASIC, D.; GODA, L.; LEVENSON, C. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus 1 model studies. **Nucleic Acid Researches**, v. 18, p. 999-1005, 1990.
- LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 1111-1115, 1993.
- LEMES, M.R.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, v. 93, n. 4, p. 287-290, 2002.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 203-221, 1987.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. GDA - Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. 2001. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 7 de jun. 2006.
- LIAN, C.; OISHI, R.; MIYACHITA, N.; NARA, K.; NAKAYA, H.; WU, B.; ZHOU, Z.; HOGETSU, T. Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 609-618, 2003.
- LIRA, C.F.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3219-3225, 2003.
- LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, 1995.

- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, p. 65–95, 1984.
- LOVELESS, M.D. Genetic diversity and differentiation in tropical trees. In: Modelling and experimental research on genetic processes in tropical and temperate forests. DEGEN, B.; LOVELESS, M.D.; KREMER, A. (eds). 2002. EMBRAPA, Belém, PA, pp 3-30.
- MACHADO, F.R.B.; VINSON, C.C.; SILVA, V.P.; CIAMPI, A.Y. Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais. 53º Congresso Nacional de Botânica, 22 a 26 de Julho, 2002. Recife, PE.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KERUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.
- MARSHAL, T. Cervus Version 2.0, 1998-2001. University of Endinburgh.
- MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, DOI 10.1007/s10592-006-9140-y, 2006.
- MATOS, D.M.S.; WATKINSON, A.R. The fecundity, seed, seedling ecology of edible palm *Euterpe edulis* in southeastern Brazil. **Biotropica**, v. 30, n. 4, p. 595-603, 1999.
- McCAULEY, D.E. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 198-202, 1995.
- MEAGHER, T.R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. **The American Naturalist**, v. 128, p. 199-215, 1986.
- MISSIAGGIA, A.A.; GRATTAPAGLIA, D. A method for microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple tailed primers. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 72-78, 2006.
- MOGENSEN, H.L. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 383-404, 1996.
- MORETZSOHN, M.C.; COELHO, P.J.A.; AMARAL, Z.P.S.; HERCOS, A.P.; TUPINAMBÁ, E.A. Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites na análise da variabilidade genética de ecótipos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 16, 2001. 25 p.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-30, 1987.
- MURAWSKI, D.A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspectives. In: LOWMAN MD, NADKARNI NM. Ed. Forest canopies, 1995. New York: Academic Press, 457-493.
- NASA, U.S. Geological Survey. data: 30/07/2001. Landsat ETM+, WRS-2, 227/062, Composição RGB – 4-5-3, Nível 1G . Sioux Falls, South Dakota: USGS.
- NASON, J.D.; HAMRICK, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. **The Journal of Heredity**, v. 88, p. 264-276, 1997.

- NEI, M. Molecular population genetics and evolution. In: Neuberger A, Tatum EL (Eds), *Frontiers of Biology*. 1975. Elsevier, New York, v.40.
- NEI, M. Mathematical models of speciation and genetic distance. In: *Population genetics and ecology* (ed. Karlim S.) Academic Press, New York, p. 723-765, 1976.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.
- NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, v. 28, p. 105-128, 1997.
- 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**, v. 12, p. 2885-289, 2003.
- OETTING, W.S.; LEE, H.K.; FLANDERS, D.J.; WIESNER, G.L.; SELLERS, T.A.; KING, R.A. Linkage Analysis with Multiplexed Short Tandem Repeat Polymorphism Using Infrared Fluorescence and M13 Tailed Primers. **Genomics**, v. 30, p. 450-458, 1995.
- OSTRANDER, E.A.; JONG, P.M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequence. **Proceedings of the National Academy of the USA**, v. 89, p. 3419-3423, 1992.
- PAETKAU, D. Microsatellites obtained using strand extension: An enriched protocol. **Biotechniques**, v. 26, p.690-697, 1999.
- PALMER, J.D. Chloroplast DNA evolution and biosystematics uses of chloroplast DNA variation. **American Naturalist**, v. 130, p. S6-S26. 1987.
- PENNINGTON, T.D. *Flora neotropica – monograph*, 52, Sapotaceae, 1990. The New York Botanical Garden, p1-2.
- PIRES-O'BRIEN J. 1998. *Manilkara multifida*. In: IUCN 2006. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <iucnredlist.org>. Acesso em: 13 mai. 2006.
- PIVETTA, M. Estoque finito na Amazônia. *Revista Pesquisa FAPESP*, n.111, p. 68-75, 2005.
- PONS, O.; PETIT, R.J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. **Genetics**, v. 144, p.1237-1245, 1996.
- POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends of Plant Science**, v. 1, p. 215-222, 1996.
- PRANCE, G.T. Forest refuges: evidence from woody angiosperms. In: Prance GT. *Biological diversification in the tropics*. 1982. New York, Columbia University Press, 137-158.
- PRENTICE, H.C.; MALM, J.U.; MATEU-ANDRÉS, I.; SEGARRA-MORAGUES, J. Allozyme and chloroplast DNA variation and mainland populations of the rare Spanish endemic, *Silene hifacensis* (Cayophyllaceae). **Conservation Genetics**, v. 4, p. 543-555, 2003.
- PRIMMER, C.R.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 493-498, 1995.
- PROVAN, J.; SORANZO, N.; WILSON, N.J.; GOLDSTEIN, D.B.; POWELL, W. A low mutation ratio for chloroplast microsatellites. **Genetics**, v. 153, p. 943-947, 1999.

- PUTZ, F.E.; REDFORD, K.H.; ROBINSON, J.G.; FIMBEL, R.; BLATE, G.M. Biodiversity Conservation in the Context of Tropical Forest Management. Biodiversity Series – Impact Studies. World’s Bank Environment Department Papers. Paper n°. 75, 2000.
- PUTZ, F.E. Science, society and tropical forests: confronting the conservation challenges. Prince Bernhard Chair for International Nature Conservation Utrecht University, 2 June 2005, 38 p.
- RAFALSKI, J.A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B. & LAI, E. (edes.) Analysis of non mammalian genomes - a practical guide. Academic Press, New York, p. 75-134, 1996.
- RAJORA, O.P.; RAHMAN, M.H.; BUCHERT, G.P.; DANCİK, B.P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 339-348, 2000.
- REBOUD, X.; ZEYL, C. Organelle inheritance in plants. **Heredity**, v. 72, p. 132-140, 1994.
- REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Management of natural populations and maintenance of genetic diversity of *Euterpe edulis*, the heart-of-palm tree. In: Recent advances in biotechnology for tree conservation and management, Florianópolis, 1997. 145-156p.
- RIBAS, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) B. considerando diferentes estádios de vida. **Scientia Forestalis**, v. 65, p. 176-187, 2004.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v. 47, p. 35-52, 1981.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v. 43, p. 848-859, 1989.
- RITLAND, K. Multilocus mating system program MLTR. Version 3.0. University of British Columbia, Canadá. 2002. Disponível em: <<http://kritland@interchange.ubc.ca>>. Acesso em: 7 de jun. 2006.
- RÖHR, H.; KÜES, U.; STAHL, U. Organelle DNA of plant e fungi: Inheritance and recombination. **Progress in Botany**, v. 60, p. 39-87, 1998.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. *Primer3*. 2000. for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds Krawetz S, Misener S), Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386. Disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi>. Acesso em: 6 de out. 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: laboratory manual. 2nd edition CSHL, 1989. Cold Spring Harbor, NY.
- SAMPSON, J.F. Multiple parternity in *Eucalyptus rameliana* (Myrtaceae). **Heredity**, v. 81, p. 349-355, 1998.
- SCHMIDT, A.B.; CIAMPI, A.Y.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. In: 50º Congresso Nacional de Genética. Sociedade Brasileira de Genética, Anais, 2004. Florianópolis, SC.

- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.
- SCHUG, M.D.; WETTERSTRAND, K.A.; GAUDETTE, M.S.; LIM, R.H.; HUTTER, C.M.; AQUADRO, C.F. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 57-69, 1998.
- SCHULZE, M.; VIDAL, E.; GROGAN, J.; ZEWEDE, J.; ZARIM, D. Madeiras nobres em perigo: As melhores práticas de manejo atuais não sustentarão a produção de madeira nas florestas da Amazônia. **Ciência Hoje**, v. 214, n. 36, p. 66-69, 2005.
- SCOLFORO, J.R.S.; PULZ, F.A.; MELLO, J.M.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Modelo de produção para floresta nativa como base para manejo sustentado. *Cerne*, v. 2, n. 1, p. 111-140, 1996.
- SEBBENN, 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**, v. 58, p. 127-143, 2000a.
- SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, A.C.E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: Implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, v. 58, p. 25-40, 2000b
- SEBBENN, A.M. Tamanho efetivo para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista Instituto Florestal de São Paulo**, v. 15, p. 147-162, 2003.
- SEBBENN, A.M.; DEGEN, B.; AZEVEDO, V.C.R.; SILVA, M.B.; LACERDA, A.E.B.; CIAMPI, A.Y.; KANASHIRO, M.; CARNEIRO, F.S.; THOMPSON, I.; LOVELESS, M.D. Modelling the long-term impacts of selective logging on genetic diversity and demographic structure of four tropical tree species in the Amazon forest. (submetido), 2007.
- SLATE, J.; MARSHALL, T.; PEMBERTON, J. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 801-808, 2000.
- SLATKIN, M. Estimating level of gene flow in natural populations. **Genetics**, v. 99, p. 323-335, 1981.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, v. 39, n. 1, p. 53-65, 1985.
- SMITH, G.P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, v. 191, p. 528-35, 1976.
- SMOUSE, P.E.; DYER, R.J.; WESTFALL, R.D.; SORK, V.L. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete Heterogeneity among females. **Evolution**, v. 55, n. 2, p. 260-271, 2001.
- SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, v. 197, p. 21-38, 2004.
- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology. I methodology. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 10, p. 199-228, 1978.
- SOKAL, R.R.; JACQUEZ, G.M. Testing inferences about micro-evolutionary processes by means of spatial autocorrelation analysis. **Evolution**, v. 45, p. 152-168, 1991.

- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; MILLIGAN, B.G. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: *Molecular Plant Systematics* (eds. SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J.), Chapman and Hall, New York, p. 117-150, 1992.
- SOUZA, L.M.F.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St. Hil. (Bombacaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 113-121, 2003.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 1105-1109, 1991.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.
- TELLES, M.P.C. Diversidade genética e estrutura populacional de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) do sudeste de Goiás. Tese (doutorado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia GO, 2000. 129p.
- TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-81, 2000.
- UHL, C.; VIEIRA, I.C.G. Ecological impacts of selective logging in the Brazilian Amazon: a case study from the Paragominas region in the state of Para. **Biotropica**, v. 21, p. 98-106, 1989.
- UHL, C.; VERÍSSIMO, A.; MATTOS, M.; BRANDINO, Z.; VIEIRA, I. Social, economic and ecological consequences of logging in the Amazon frontier: the case of Tailândia. **Forest Ecology and Management**, v. 46, p. 243-273, 1991.
- VALLE, D.; SCHULZE, M.; VIDAL, E.; GROGAN, J.; SALES, M. Identifying bias in stand-level growth and yield estimations: A case study in eastern Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 236, p.127-135, 2006.
- van GARDINGEN, P.R.; VALLE, D.; THOMPSON, I. Evaluation of yield regulation options for primary forest in Tapajós National Forest, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 231 p. 184-194, 2006.
- VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; MATTOS, M.; TARIFA, R.; UHL, C. Logging impacts and prospects for sustainable forest management in an old Amazonian frontier: the case of Paragominas. **Forest Ecology and Management**, v. 55, p. 169-199, 1992.
- VERÍSSIMO, A.; UHL, C.; MATTOS, M.; BRANDINO, S.; VIEIRA, I. Impactos sociais, econômicos e ecológicos da exploração seletiva de madeiras numa região de fronteira na Amazônia Oriental: o caso de Tailândia, 09-46. In: *A expansão da atividade madeireira na Amazônia: impactos e perspectivas para o desenvolvimento do setor florestal no Pará*. IMAZON, Belém PA, 1996.186p.
- 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**, v. 5, p. 33-34, 2005.
- VINSON, C.C. Isolamento de Microsatélites de Espécies Madeireiras no Contexto da Sustentabilidade Genética no Manejo Florestal. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Pará, Belém PA, 2004. 71p.

- WATTIER, R.; ENGEL, C.R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VALERO, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1569-1573, 1998.
- WEBER, Z.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Annual Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.
- WEIR, B.S. Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. North Caroline State University, Sinauer Associates Inc. Pub., Sunderland, Massachusetts, 1996. 445 p.
- WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome/Genomé**, v. 42, n. 1, p. 9-19, 1999.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.
- WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliceae family. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 1995-1997, 1997.
- WHITE, G.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **PNAS**, v. 99, n. 4, p. 2038-2042, 2002.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WRIGHT, S. Evolution in mendelian population. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 73, p. 2271-2277, 1991.
- YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 413-418, 1996.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16. 2002.
- ZUCCHI, M.I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Universidade de São Paulo - USP. 2002. 130p.
- ZURAWSKY, G.; CLEGG, M.T.; BROWN, A.H.D. The nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. **Genetics**, v. 106, p. 735-749, 1984.

ANEXO 1 - ARTIGO 1 –

Azevedo, V.C.R.; Vinson, C.C.; Ciampi, A.Y. Twelve Microsatellite Loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian Timber Species. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 11-13, 2005.

Twelve Microsatellite Loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian Timber Species.

Azevedo, V.C.R. ^{†§}, Vinson, C.C. ^{†*}, Ciampi, A.Y. [†]

[†] Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte Final, CEP 70770-900, Brasília DF, Brazil.

[§]Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brazil.

^{*} Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, PA, Brazil.

Keywords: microsatellite, genetic diversity, conservation, *Manilkara huberi*, Sapotaceae.

Correspondence: Dra. Ana Y. Ciampi e-mail: aciampi@cenargen.embrapa.br

Present address: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte Final, Brasília DF, CEP 70770-900, CP 02372.

Running title: **Twelve Microsatellite Loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian Timber Species.**

Abstract

Manilkara huberi is a timber species, intensely exploited and found in the Amazonian forest. Twelve highly polymorphic microsatellite loci were developed from a genomic library enriched for AG/TC repeats. Levels of polymorphism were evaluated using a total of 12 adult trees from a natural population. An average of 6.43 alleles per locus was detected, and expected heterozygosity ranged from 0.721 to 0.862. These loci represent a powerful tool to investigate mating system, gene flow, parentage and population dynamics in natural populations of *Manilkara huberi*, all of which are needed to implement sound management.

Simple Sequence Repeats (SSR) or Microsatellites exhibit high levels of variability because of differences in the number of repeated units. The high allelic diversity and abundance of microsatellites in the eukaryotic genome make these codominant molecular markers popular for detailed genetic studies. The Dendrogene Project (*Genetic Conservation within Managed Forests in Amazônia*) is interested in conservation and management strategies of timber trees from the Amazonian forest (Kanashiro *et al.*, 2001), such as *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), a species intensively harvested by the timber industry. As part of this project, we report the development of 12 microsatellite markers; the first on microsatellite cloning for *Manilkara huberi*.

Total genomic DNA was extracted from expanded leaves of a single individual of *Manilkara huberi*, and digested with *Tsp509 I*. Fragments were separated on a 2% agarose gel, and those from 300 to 800 bp were used to construct an enriched genomic library, as described by Rafalsky (1996). These fragments were ligated into a pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI) and transformed in *E. coli* XL1-Blue, which were grown overnight on 1x LB agar containing ampicilin, Xgal and IPTG. Positive clones were selected by hybridization with a poly AG/TC probe and sequenced on an ABI 377 Applied Biosystem (Perkin Elmer, CA) automatic sequencer. Primers to the flanking regions were designed using the Primer 3 Output software (Rozen & Skaletsky, 2000). Microsatellite loci were amplified using polymerase chain reaction (PCR) in 13 μ l containing: DNA (3 η g), PCR reaction buffer (1x), forward primer (0.28 μ M), and reverse primer (0.28 μ M), MgCl₂ (1.5mM), BSA (0.25 mg/ml), dNTP (0.25 mM) and Taq polymerase (1.3 U). PCR conditions were: denaturation at 94°C for 5 minutes; 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at T_a (Table 1) for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72°C for 7 min. Reaction products were separated on polyacrylamide gel and visualized by silver staining. Polymorphism was evaluated using a total of 12 adult trees from a natural population from the

National Forest, Tapajós, Pará, Brazil. Alleles were sized relative to a 10 bp ladder. Number of alleles per locus, mean observed and expected heterozygosities were calculated using GDA – Genetic Data Analysis version 1.0 (Lewis & Zaykin, 1999). Probabilities of paternity exclusion (Slate, 2000) were estimated using Cervus (Marshall, 1998-2001) (Table 1).

Twenty-nine clones contained both microsatellite and appropriate flanking regions for primer design. We successfully amplified 23 primer pairs. Of those, 9 were monomorphic, and 14 were variable. Levels of variability detected in 12 loci were high, with the number of alleles ranging from four to eight, and these were selected to be used for genetic analysis. Ten of the 12 loci had observed heterozygosity greater than 50%. Two loci (Mh06 and Mh24) showed departure from Hardy-Weinberg expectations ($P < 0.005$), but no pairwise disequilibrium was detected between the twelve loci. The deficits of heterozygous genotypes are consistent with the presence of null alleles in these two loci, at a frequency of 0.298 for Mh06 and 0.652 for Mh24. These two loci with high null allele frequencies should be used only with great caution for paternity exclusion analysis due to the possibility of excluding the true father or non-excluding a wrong father. The first estimate of paternity exclusion probability $\text{Pr}(\text{Ex}_1)$, when the offspring is sampled but the mother is not, varied from 0.295 to 0.5 (mean= 0.408) for individual loci and was 0.9983 for the combined loci. The second estimate, $\text{Pr}(\text{Ex}_2)$, when both the mother and the offspring are sampled, varied for individual loci from 0.473 to 0.672 (mean= 0.514) and was 0.99998 for the combined loci (Table 1).

This study shows that these SSR loci allow very precise individual discrimination and paternity testing. The 12 microsatellites developed exhibited a large number of alleles per locus and high heterozygosity. This suggests that these loci will be useful for further population genetic studies of natural populations. As part of the Dendrogene Project we are currently using these markers to investigate questions of genetic diversity, paternity, spatial genetic structure, and mating system in a natural population of *Manilkara huberi* with the aim

of applying scientific knowledge to promote sustainable management in the Brazilian Amazon forest.

Acknowledgements

The authors thank Valci Pereira da Silva and Tályta Nayza Almeida for their technical assistance at the laboratory. José Campolina and his group for their help collecting samples at the FLONA Tapajós; Dr. Milton Kanashiro and Ian Thompson coordinators of the Dendrogene Project (www.cpatu.embrapa.br/dendro); DFID, IBAMA and EMBRAPA for their support at the project.

References

- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2^a ed. Embrapa Cenargen, Brasília, DF. 220 pp.
- Kanashiro M, Thompson IS, Yared JAG, Loveless MD, Coventry P, Martins-Da-Silva RCV, Degen B, Amaral W (2001) Improving conservation values of managed forests: The Dendrogene Project in the Brazilian Amazon. *Unasylva* 209.
- Lewis PO, Zaykin D (2001) *Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c)*. <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- Marshall T (1998-2001) Cervus Version 2.0, University of Edinburgh.
- Rafalski JA, Morgante M, Powell W, Vogel JM, Tingey SV (1996) Generating and using DNA markers in plants. In: Birren, B. & Lai, E. (edes.) *Analysis of non mammalian genomes - a practical guide*. Academic Press, New York, pp 75-134.

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) *Primer3* on the http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds Krawetz S, Misener S), Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: laboratory manual*. 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY.

Slate J, Marshall T, Pemberton J (2000) A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology* 9: 801–808.

Table 1. Information on the twelve microsatellite marker loci of *Manilkara huberi*. Allele size range (bp), annealing temperature (T_a °C), number of individuals (N), total number of alleles per locus (A), expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o), paternity exclusion probabilities ($\text{Pr}(\text{Ex}_1)$ and $\text{Pr}(\text{Ex}_2)$) in 12 individuals.

Locus	Repeat Array	Primer Sequence (5' – 3')	Allele Size range bp	T _a °C	A	He	Ho	Pr(Ex ₁)	Pr(Ex ₂)	Accession no.
Mh 03	(CT) ₁₇	F: CACTTCTGTCTCTCTCCTCGT R: GGGTGATTGCAGAGACGTA	176-204	56	7	0.859	1.000	0.477	0.650	AY514005
Mh 04	(CT) ₁₂	F: GCACTCTCCATGGTTCCAGT R: AAAGAGTCAATGGCGTGAGC	189-209	52	5	0.768	0.583	0.319	0.492	AY514006
Mh 06	(GA) ₁₄	F: ACACGCACAAAACAAACCAA R: TTCTTGAAGGAGGGTTGCTC	162-188	56	7	0.754	0.417	0.325	0.502	AY514007
Mh 07	(CT) ₂₃	F: ATTGCAGCATATCCACACCA R: GCAAAGGGTGATGGGTTAGA	153-187	56	4	0.746	0.750	0.300	0.473	AY514008
Mh 08	(CT) ₁₁	F: GTAATGGGAGCCGTTGAGA R: CTGGGTAGCATTGTTGCAT	172-202	56	7	0.862	0.917	0.485	0.659	AY514009
Mh 12	(CT) ₉ (AC) ₆	F: TGCGGAAGTGTGAAAGAGT R: ATCCACAGCAATGACTGACG	187-211	56	7	0.859	0.667	0.481	0.655	AY514010
Mh 17	(CT) ₁₃	F: CACGATGACCTCTCAGTGGA R: CCTGTGTATGCGTTCGATTG	240-274	56	6	0.721	0.750	0.295	0.480	AY514011
Mh 19	(CT) ₂₁	F: AATTACAACCAAAGCTCCACTT R: TGAGAGTCTTTTCGCACTTTCA	146-164	56	7	0.862	0.750	0.500	0.672	AY514012
Mh 20	(GA) ₁₃	F: GAAGTTTGACCATTGGAAT R: GACATAACACTAACCCTTCACGA	134-166	56	8	0.848	0.833	0.458	0.632	AY514013
Mh 22	(CT) ₁₅	F: CCCATTATAGCCCTCCACCT R: AGAGAGCACATGCAAGCTCA	180-206	56	7	0.841	0.833	0.449	0.627	AY514014
Mh 24	(CT) ₁₇	F: CCACTTCTGTCTCTCTCCTCGT R: GACATTGTGGGTGATTGCAG	181-209	60	7	0.815	0.167	0.404	0.582	AY514015
Mh 26	(CT) ₁₄	F: TGCTCAGACTGCTTTCTTTTGG R: TGCAATAAGTGTGATTGGAGAA	224-250	58	6	0.819	0.583	0.400	0.579	AY514016
Mean					6.43	0.813	0.688	0.408	0.514	

**Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A.Chev.,
a heavily logged Amazonian timber species**

Vânia C.R. Azevedo ^{†§}, Milton Kanashiro ^{*}, Ana Y. Ciampi [†] and Dario Grattapaglia[†]

[†] Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB final W5 Norte, CEP 70770-900, PoBox 02372, phone: +55 61 34484645, fax: +55 61 33403624. Brasília DF, Brazil.
azevedovcr@cenargen.embrapa.br.

[§] Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, Campus Universitário Darcy Ribeiro, ICC Sul, Brasília, DF, Brazil.

^{*} Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brazil.

Acknowledgements

This publication is a result of the Dendrogene Project: Genetic conservation within managed forests in the Amazon (2000–2004 <http://www.cpatu.embrapa.br/dendro>) executed by Embrapa Amazônia Oriental and their partners in the bilateral cooperation between Brazil and United Kingdom through the Brazilian Cooperation Agency (ABC) and the Department for International Development (DFID). The authors thank Valci Pereira da Silva, Tályta Nayza Almeida for technical support at the laboratory and Ian Thompson (DFID) for his valuable comments. Vânia C. R. Azevedo has received a Ph.D. scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil).

Running title: **Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi***

Abstract

Manilkara huberi is an intensely exploited Amazonian tree species due to the high density and resistance of its wood. This research aims to study the genetic structure of *M. huberi* in order to generate useful information for the design of conservation and management strategies. Analyses of the spatial distribution pattern, genetic structure and mating system were carried out. All individuals from two generations, sampled from a natural population at Flona Tapajós, PA, Brazil were genotyped at 7 highly polymorphic microsatellite loci. For the adults and the seedlings the following estimates were obtained, respectively: observed heterozygosity (H_o) 0.706 and 0.626; expected heterozygosity (H_e) 0.856 and 0.824; intrapopulation fixation index (f) 0.175 and 0.240. A spatial autocorrelation analysis detected a significant spatial genetic structure up to a radius of approximately 300 m. The multilocus (t_m) population outcrossing rate was high (0.995), suggesting that the species is predominantly allogamous with a pollen flow restricted to 47 m. *M. huberi* is highly spatial structured and fragmentation may cause loss of several subpopulations. These results fit into isolation by distance model of genetic structure and suggest that conservation management programs should include large areas. The genetic data also reveal that for *ex situ* conservation, seeds must be collected from at least 175 maternal trees in order to keep an effective population size of 500 individuals. Furthermore, as the species is widely distributed across the Amazon Forest, samples should target several populations in order to conserve the highest genetic diversity possible.

INTRODUCTION

The Amazonian Forest covers about 40% of the Brazilian territory and it is one of the largest world reservoirs of biodiversity. A total of about 4,000 to 5,000 tree species are estimated to exist in the Amazon region (Rodrigues, 1989) *apud* (Ferraz *et al.*, 2004) and some of them are commercially exploited by selective cutting due to the value of its wood. This exploitation method both ecologically and economically irrational, has been going on for centuries in the Amazon region. Not only is it an unsustainable management system but it is also arbitrary regarding what species can be harvested, as if all were equally affected regardless of the intensity by which they are selectively exploited. In the last three decades, following the exhaustion of the native forests of southern Brazil, this uncontrolled exploitation has grown to a point that the Amazon forest is now the leading supplier of high quality timber (Veríssimo *et al.*, 1996).

Timber harvesting by selective exploitation, lead to habitat fragmentation and to a drastic reduction of the number of reproductive individuals with serious consequences to the maintenance of diversity and long term survival of tree populations. Fragmentation is particularly frequent in tropical forests that contain some of the highest levels of biodiversity on earth. Selective harvesting of trees, usually the dominant and reproductive ones, may generate spatial isolation of the remaining individuals, thus increasing inbreeding (Young *et al.*, 1996). Although the uncontrolled exploitation of tropical forests is a common occurrence, little is known about its effect on the mating system, gene flow and genetic diversity of the main target species.

A better understanding of the demographic characteristics, population dynamics (Matos *et al.*, 1999) and patterns of genetic diversity (Ciampi *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 1997) is a key component of any sustainable conservation management plan. Unfortunately, it has not

been considered when devising programs of tropical forests management (Sebbenn *et al.*, 2000a). Genetic studies of managed tree species with the objective of assessing the impact that exploitation can cause can help defining adequate management strategies for each species, which in turn would allow a better combination of conservation and utilization practices.

Manilkara huberi, commonly known as Maçaranduba, is a native tree species of the Amazonian Forest, belonging to the Sapotaceae family. This species reaches up to 50 meters of height, with an erect and cylindrical trunk with up to two meters of diameter. This is one of the most widespread Amazonian tree species with a very slow growth rate and classified as a climax species in the successional group. It is a hermaphrodite species with flowering and reproduction occurring in alternate intervals between three to five years. Due to its very hard and resistant wood it has been a preferred target of selective harvesting by the timber industry. No information exists on the genetics of this species.

As part of the Dendrogene project (Kanashiro *et al.*, 2001), with the objective of applying scientific knowledge to promote sustainable management of the Brazilian Amazonian Forest, we chose to examine the spatial genetic structure and mating system of a natural population of *M. huberi*. Based on the genetic data gathered we discuss the potential impacts of selective timber exploitation on genetic diversity, and propose strategies for *in situ* and *ex situ* conservation and sustainable management of the species.

MATERIAL AND METHODS

Study site, sampling and DNA extraction

The studied population covers a 200 ha area of primary forest of *terra firme* in the Brazilian Amazon, at Tapajós National Forest (FLONA Tapajós), at km 83 of route BR-163 Santarém-Cuiabá in Belterra county state of Pará (Figure 1). This area is within an ISP (Intensive Studies Portion) plot used for ecological and genetic studies in the context of the Dendrogene Project. In total, the population sampled for the genetic study included 294 trees with d.b.h. starting from 10 cm (50% of the trees selected in a random way) (Figure 1) and 810 seedlings distributed in 27 open pollinated maternal families. Tissues used for DNA extraction were cambium samples of the adults and leaves from progeny seedlings. Leaf tissue was obtained after germination of seeds collected during the period of fruit dispersion. Genomic DNA extraction from cambium and leaves were carried out by a CTAB based procedure (Doyle and Doyle, 1987) adapted by Machado *et al.* (2002) that uses a Fastprep Cell Disruptor - BIO 101 SAVANT for tissue homogenization.

Figure 1

Microsatellite genotyping

Genetic analysis was carried out using microsatellite markers developed and optimized for *M. huberi* (Azevedo *et al.*, 2005). A multiple tailed primer method with fluorescence detection of 6-FAM, HEX and NED labeled human microsatellite primers (Missiaggia and Grattapaglia, 2006) was used. As that system involves three primers, the tailed one, longer than normal (40pb), new optimizations were necessary for the twelve loci employed. The PCR reactions had a final volume of 13 μ l, containing 3 ng of genomic DNA, 1x of PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 0.27 μ M of each primer, 2.0 mM of MgCl₂, 0.25 mg/ml of BSA (New England Biolabs), 0.25 mM dNTP and 1.3U Taq polymerase (Phonetría) and ultrapure water. The amplifications were carried out using a ABI9700 thermocycler (Applied Biosystems) with the following conditions: hot start at 94°C for 10

minutes, 35 cycles of 94°C for 30 seconds, locus specific annealing temperature for 45 seconds (Table 1), and 72°C extension for 45 seconds. After 35 cycles, a final stage of extension of 30 minutes at 72°C was added. The PCR products were analyzed by electrophoresis in an ABI-Prism 377XL sequencer (Applied Biosystems). The ROX labeled fluorescent internal size standard used was developed by Brondani and Grattapaglia (2001).

Data analysis

Genetic diversity. Seven polymorphic microsatellite loci were characterized for number of alleles per locus (A), allele frequency, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity under Hardy-Weinberg expectation. Tests for HWE and two-loci linkage disequilibrium were also carried out. Wright fixation indexes (f and F) were estimated based on all individuals genotyped from both generations. The consistence of the estimates was calculated by a bootstrap resampling using 10,000 permutations. Genetic analyses were carried out using the software Genetic Data Analysis (GDA; Lewis and Zaykin, 2001).

Spatial genetic structure. To analyze the intra-population spatial genetic structure the geographic coordinates (GPS) of the sampled trees were registered. The presence and extension of spatial genetic structure within the population was based on all seven microsatellite loci and all 294 sampled trees. All the possible pairwise combinations of trees were considered for each one of the pre-defined distance classes. This estimate was obtained by calculating the Moran's I index (Sokal and Oden, 1978) and the Loiselle *et al.*, (1995) coancestry coefficient (θ_{xy}) for each distance class and locus and for the overall locus mean. These analyses were carried out using the software SGS (Degen *et al.*, 2001; Degen, 2003) and

Spagedi version 1.1 (Hardy and Vekemans, 2002), respectively. Moran's I index values were used to test the significance of the deviations of the expected values from the null hypothesis of random distribution using a Bonferroni correction. The 95% confidence interval of the medium coancestry coefficient for each distance class was built based on the standard deviation of the average of the estimates, obtained by jackknifed permutation among loci.

Gene flow. Gene flow through pollen was evaluated within the open pollinated progenies using the software TWO-GENER (Smouse *et al.*, 2001). The principle of this method is to estimate Φ_{ft} , the differentiation of allele frequencies among the pollen pools sampled by several females in the population. The relation between Φ_{ft} and dispersal distance has been derived for given dispersal curves (Austerlitz and Smouse, 2001). The parameter is calculated by an analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992). Other estimated parameters were: the medium pollen flow distance (δ) and the density of reproductive trees per hectare (d). A 95% confidence interval of Φ_{ft} was calculated by performing 10,000 bootstraps resamplings.

Mating system. The preferential system of mating was assessed based on a mixed mating model (Ritland and Jain, 1981) and correlated mating model (Ritland, 1989), using the software Multilocus MLTR (Ritland, 2002). The following estimates were obtained: the multilocus population outcrossing rate (t_m); the average singlelocus outcrossing rate (t_s); the biparental inbreeding, i.e. mating among related individuals ($t_m - t_s$); the correlation of outcrossed paternity within progeny arrays ($r_{p(m)}$) corresponding to the probability that a randomly chosen pair of progeny individuals from the same family are full sibs (Ritland, 1989); the self-pollination correlation ($r_{p(s)}$); the size of the neighborhood, or the number of

pollen donors, $(1/r_p)$. The standard errors were obtained by 1,000 bootstraps resamplings across families.

To verify the potential occurrence of genetic structure within progenies, a coancestry coefficient (θ_{xy}) between plants within progeny was estimated. This coefficient is obtained from the relatedness coefficient (r_{xy}), calculated based on the mating system parameters, according to Ritland (1989),

$$\hat{r}_{xy} = 0.25(1 + \hat{F}_m)[4\hat{s} + (\hat{t}_m^2 + \hat{r}_{p(s)}\hat{t}_m\hat{s})(1 + \hat{r}_{p(m)})],$$

where F_m is the inbreeding coefficient of the parental generation, s is the selfing rate $(1 - t_m)$, and the other parameters were defined previously. In diploid species, in the absence of inbreeding, the relatedness coefficient r_{xy} is twice the coancestry coefficient θ_{xy} that is,

$$\hat{\theta}_{xy} = \hat{r}_{xy} / 2.$$

To detect the genetic representativeness of families the variance effective size ($N_{e(v)}$) was estimated which, as demonstrated by Cockerham (1969), can be obtained from the coancestry coefficient (θ_{xy}),

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0.5}{\hat{\theta}_{xy} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1 + \hat{F}_p}{2n}},$$

where F_p is the progeny intrapopulation fixation index. The maximum theoretical value of $N_{e(v)}$ in an ideal population's simple progeny (infinite size, panmictic, without selection, mutation or migration) is approximately four. From the estimate of the variance effective size ($N_{e(v)}$) the number of maternal trees necessary to keep the effective size ($N_{e(ref)}$) equal to 500 was estimated by $\hat{N}_{e(ref)} / \hat{N}_{e(v)}$, as shown by Sebbenn (2003).

RESULTS

Microsatellite markers

Among the twelve polymorphic loci available from the development study (Azevedo, *et al.*, 2005) just one, Mh12, did not amplify. Seven were selected for the analysis based on higher information content and robustness of the analysis with the multiple tailed primer method. The mean number of alleles/locus (A) in the adults' generation varied from 15 (Mh22) to 20 (Mh17, Mh20) with a mean of 17.7, totaling 124 alleles. In the progeny population the mean number of alleles/locus varied from 14 (Mh04, Mh22) to 24 (Mh06), with mean of 18.1, adding totaling 127 alleles (Table 1). High levels of multiallelism were observed at all seven loci analyzed in both generations. Slightly more alleles were observed in the progeny population when compared to the adults and both generations displayed private alleles, suggesting that the reproductive population is actually larger than the one genotyped. However by comparing the frequency of the more frequent alleles between the two generations no significant differences were observed. Discrepancies were thus limited to rarer alleles.

Table 1

Population genetic parameters

All seven microsatellite loci displayed high levels of polymorphism within both generations. The mean values of expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosity, and the

intrapopulation fixation index (f) were high at almost all loci, and \hat{H}_e was higher than H_o at all loci sampled. A significant intrapopulation fixation index (f) was observed in both generations (Table 2). The mean value of f was not significantly different between the two generations, in agreement with the deviation observed in the progeny population. The intrapopulation fixation index (f) for all individuals (both generations) displayed values similar to the ones obtained for each generation separately. A Fisher exact test revealed deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium at all loci, with an excess of homozygotes at all loci. Linkage disequilibrium tests detected significance among two pairs of loci Mh17/Mh20 ($P=0.013$) and Mh20/Mh22 ($P=0.001$) for the adult generation.

Table 2

Spatial genetic structure

The spatial autocorrelation analysis detected a significant spatial genetic structure up to a radius of approximately 300 m based on the Moran's I index, suggesting that seeds are dispersed at a rather short distance. A continuous decrease in the autocorrelation values was detected with increasing distances and from 900 m on it showed significant negative values, suggesting that nearby trees are genetically related and distant trees are not (Figure 2A). This behavior is consistent with isolation by distance model of gene flow.

A similar result was obtained when using the software Spagedi that calculates the coancestry coefficient based on the method described by Loiselle *et al.*, (1995) (Figure 2B). This analysis also indicated significant positive values up to 300 m and negative significant values starting from about 1,000 m, judging by the 95% confidence interval. The largest

coancestry coefficient was estimated in the first class of distance (zero to 100 m, $\hat{\theta}_{xy} = 0.042$; $P < 0.05$), which is below the one expected for second degree cousins (0.0312).

Figure 2

Gene flow and mating system

The global estimate of Φ_{ft} was 0.145 (95% confidence interval). Given that the average distance between the sampled females (\bar{D}) was 739 m, this translated into an estimate of a pollen dispersal distance δ of 47 m (± 0.73 m) assuming a normal pollen dispersal function. The estimate of the density of reproductive trees for hectare (d) was 1.9. Multilocus outcrossing rates ranged from 0.96 to 1.2 across the 27 families, with the average across all seedlings ($n = 810$) of 0.995 (± 0.003), indicating that *M. huberi*, like most tropical trees studied to date, is predominantly outcrossed but capable of self-fertilization (Nason and Hamrick, 1997). Single-locus estimates varied from 0.90 to 1.2 across families, with the average for all seedlings of 0.718 (± 0.012) lower and significantly different from the multilocus outcrossing rate. The difference between the two estimates ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0.277 \pm 0.012$) was highly significant, suggesting that biparental inbreeding, i.e. mating among relatives is a frequent occurrence. The multilocus correlation of outcrossed paternity ($r_{p(m)}$), suggests that 18.9% of the progeny are full-sibs (0.189 ± 0.022) (Table 3). The single-locus correlation of outcrossed paternity ($\hat{r}_{p(s)} = 0.197$ or 19.7%) was higher than the multilocus, but not significantly different. Coancestry estimations within the progenies showed values ($\hat{\theta}_{xy} = 0.175$) that were between the expected in half-sibs (0.125) and full-sibs (0.25). With the estimation of the variance effective size $\hat{N}_{e(v)} = 2.85$, the minimum number of mother trees to

be considered in a seed collection program for *ex situ* conservation was estimated. For long term maintenance of genetic diversity, seeds should be collected from at least 175 trees.

Table 3

Subpopulation analysis

As the studied population covered a relatively large area of 200 ha, a tentative subpopulation analysis of all adult individuals was carried out by distributing all adults in ten d.b.h. classes. Little significant variation for the estimated parameters was observed across classes. The mean values of f and F were positive and significant, indicating excess of homozygotes within each d.b.h. class simply reflecting what had been detected previously for the whole population. No significant difference among the d.b.h. classes as estimated by θ - P was detected. The 21-30 cm and 71-80 cm classes displayed the higher values of f (0.235 and 0.228 respectively) and the 101-140 cm class had the lowest value (0.086). When subdivided in two subpopulations (1) non commercial trees (d.b.h. < 45 cm) and (2) commercial trees (d.b.h. > 45 cm) the genetic divergence between them was low and also not significant (data not shown).

DISCUSSION

All the seven loci used for the genetic analysis in this work detected high levels of multiallelism, confirming the high expected genetic information content of these markers for studies of *M. huberi* populations (Azevedo *et al.*, 2005). The detection of alleles in the progeny and not in the adults can be due as much to pollen coming from outside of the sampled area, as due to pollen from individuals inside of the area that were not sampled.

Alleles detected in the adults and not in the progeny implicate differential reproductive success or sampling effect of progeny individuals.

The mean heterozygosity estimates ($\hat{H}_e = 0.843$ and $\hat{H}_o = 0.648$) indicate high genetic diversity and a relatively high level of inbreeding in the studied population, evidenced by the high value of f (0.231) in both generations and in all d.b.h. classes of the sampled adults, favoring the hypothesis that the species actually undergoes a significant level of selfing of related matings thus deviating from panmixia and not that overestimation has occurred due to the presence of null alleles. Similar results were obtained for *Swietenia macrophylla* (Novick *et al.*, 2003), *Caryocar brasiliense* by Collevatti *et al.*, (2001), *Dinizia excelsa* by Dick *et al.*, (2003) and *Symphonia globulifera*, *Vouacapoua americana* and *Sextonia rubra* by Hardy *et al.*, (2006). Different results for the intrapopulation fixation index have been found for other tropical species such as *Carapa guianensis* (Dayanandan *et al.*, 1999) and *Swietenia humilis* (White and Powell, 1997) where no deviation from HW proportions were seen.

The establishment of large-scale sampling programs to assess genetic diversity and allow an accurate view of the genetic landscape is usually the limiting factor when the goal is to apply autocorrelation techniques (Diniz-Filho and Telles, 2001). Some researchers have pointed out that spatial autocorrelation analyses should not be carried out with fewer than 20 or 30 samples (Sokal and Jaquez, 1991). In the case of *M. huberi* the spatial patterns are clear, as the spatial autocorrelation seems to be powerful enough to detect population spatial structure. Our analysis was carried out with 294 individuals in an area of 200 ha by using two autocorrelation techniques, namely, by interpreting the average Moran's I index and Loiselle's *et al.*, (1995) coancestry coefficient. The application of the spatial autocorrelation analysis to define units for conservation is useful when it is possible to recover the main

patterns of genetic variation across the geographic landscape (Diniz-Filho and Telles, 2001). This is expected to preserve most of the existing genetic variation.

Dispersion of seeds to restricted distances has been observed for other tropical species whose dispersers are small animals as in the case of *Carapa guianensis* (182 m) and *Vouacapoua americana* (176 m) and even for species whose dispersers are bats, birds and arboreal mammals as *Symphonia globulifera* (141 m) (Hardy *et al.*, 2006). For tropical forest tree species, Boshier *et al.*, (1995), showed that for *Cordia alliodora* near neighbors were highly genetically related, in comparison with distant trees. Hamrick *et al.*, (1993) showed that spatial genetic structure was present in intermediate-diameter classes for *Platypodium elegans*, *Alseis blackiana* and *Swartzia simplex* in Panama.

In spite of the high outcrossing rates (99%) detected in the population, the test of Hardy-Weinberg Equilibrium showed deviation from random mating, which might have been caused by mating among relatives and self-fertilization. Due to the floral structure of the species, selfing within the same flower is prevented, since the pollen shed and stigma maturation occur at different times. However, selfing might happen among different flowers of the same tree. Results indicating a low selfing level were expected, since hermaphrodite species commonly possess auto-incompatibility systems to avoid selfing. This mechanism usually maintains selfing at low levels. Murawski (1995) showed that at least 34% of the tropical tree species show some auto-incompatibility. In spite of this low selfing rate, the outcrossing rate among relatives is high (27.7%), an aspect that contributes to inbreeding. Mating among relatives happens due to the high density of the species in the primary forest and due to synchronous flowering, which generates a dense offer of flowers at a short distance.

The correlation of outcrossed paternity within progeny arrays ($r_{p(m)}$) in *M. huberi* was estimated as 18.9%, indicating that this phenomenon contributes considerably to the

inbreeding seen in the species. The presence of correlated paternity in the progeny derived from open pollination appears not from fertilization of flowers with random pollen samples of the population as a whole, but due to pollen sampling from only a few sources and pollination events (Sampson, 1998). The estimated number of pollen donors per tree was 5.9, which is lower than the estimate for other tropical tree species such as *Solanum lycocarpum* (10.2 to 10.49) by Martins *et al.*, (2006). Due to its influence on the creation, maintenance and erosion of the genetic structure of the adult population it is important to understand which factors influence pollen movement, which is why the knowledge of the gene flow patterns through pollen in a natural population is so important. If a pollen donor population suffers isolation by distance, it can result in an increased contribution of pollen from local reproductively active trees and the generation of genetic structuring in the pollen pool (Dyer and Sork, 2001).

The mean distance of pollen flow obtained was extremely low ($\hat{\delta} = 47\text{m}$). The restricted pollen flow can be related to the reproductive biology of the species. *M. huberi* behaves supranually, though intense flowering events so that most of the trees in flowering stage bloom simultaneously. The intense localized offer of flowers allows the pollinators to forage restricted areas, as it is unnecessary to search for food at long distances. Pollinators of *M. huberi* are insects such as flies and bees of medium size, which forage at a distance of up to 2000 m, in other words, much higher than the mean distance of pollen flow detected. In a similar fashion, low pollen flow was detected in an undisturbed population of *Dinizia excelsa* (212 m), a tropical tree species, by Dick *et al.*, (2003).

The estimate of genetic divergence of the crossed pollen revealed that the pollen that fertilized the different maternal trees was genetically heterogeneous ($\Phi_{\text{it}} = 0.14$). In other words, 14% of the variation in the allele frequencies of the crossed pollen in the population was among the maternal trees. This estimate of the divergence among the crossed pollen

obtained for *M. huberi* is much higher than the estimate obtained for the species pollinated by animals *Albizia julibrissin* ($\Phi_{ft} = 0.062$, Irwin *et al.*, 2003). High estimates of Φ_{ft} indicates low pollen flow.

Conservation implications

Microsatellite markers have been important tools to quickly generate a detailed picture of the genetic diversity and structure of a population to then help devise strategies for sustainable forest conservation and management practices. Lemes *et al.*, (2003) suggested *in situ* conservation strategies of *Swietenia macrophylla* in order to preserve large areas to minimize the loss of diversity due to genetic drift. Bottin *et al.*, (2005), in their study of *Santalum austrocaledonicum*, suggested conservation strategies and the definition of two ESUs (evolutionary significant units) based on the estimates of F_{ST} values.

The sum of the results obtained in this study, such as, relatively high and consistent inbreeding levels, high and significant spatial structuring due to a low seed as well as low pollen flow, suggest that isolation by distance is the hypothesis that better explains the observed data in *M. huberi*. The isolation by distance pattern found in this study is consistent with other large-scale studies of tropical trees, such as *Euterpe edulis* in the Atlantic Forest (Cardoso *et al.*, 2000) *Caryocar brasiliense* in the Cerrado of Brazil (Collevatti *et al.*, 2001) and *S. macrophylla* in the Amazon region (Lemes *et al.*, 2003; Novick *et al.*, 2003). It is known that the oldest and tallest adult individuals of a forest, although in small number, are those that indeed contribute with the largest proportion of the genetic variability in the population and they should be the targets of highest priority when establishing *in situ* genetic reserves.

Common forest management practices eliminate a large number of reproductively active individuals, i.e. about 90% of all those with d.b.h. starting from 45 cm, leaving behind only young individuals of smaller diameters. These trees produce smaller amounts of ovules and pollen. Taking into account the largest distance among the reproductive individuals, the probability of related individuals participating in the reproduction process is reduced. While the probability of generating progeny due to mating among relatives is reduced, the probability of self-fertilization is increased, also due to the larger distance among the remaining reproductive trees. However, the selfing is most likely rare in the case of *M. huberi*, since this species occurs at high density so that even after exploitation, many reproductive individuals remain in the area (d.b.h. between 35 cm and 45 cm). In addition, it is not known if selfed individuals are able to reach sexual maturity and reproduce, which is largely dependent on the extent of the genetic load. The reduction of the reproductively active population by management causes a well known genetic bottleneck effect, leading to consequences such as reduction in heterozygosity due to genetic drift, characterized by (a) loss of low frequency alleles, (b) increased relatedness among individuals and (c) increased levels of population inbreeding, which were found to be relatively high in the studied *M. huberi* population when compared to other tropical trees. However, Dick (2001) reported that *D. excelsa* produced approximately three times more seeds per tree in a disturbed area and most of them were cross-fertilized.

Deviations from random mating, the high correlated paternity and the likely behavior by isolation by distance pattern of gene flow found for *M. huberi* have strong implications for *in situ* conservation as well as seed collection strategies for pre-breeding or recovery of degraded areas. In a species such as *M. huberi*, genetic conservation must be integrated into different forms of forest management. The designation of *in situ* conservation programs by defining parks and reserves may represent the major component of the conservation strategy,

especially if those areas are not already fragmented. Management programs must include large areas in order to conserve the highest genetic diversity possible, since *M. huberi* is highly spatially structured and fragmentation may cause loss of several subpopulations. This strategy may minimize the loss of diversity due to genetic drift and maximize the conservation efficiency of the regional genotypic diversity. For *ex situ* conservation, seeds should be collected from at least 175 maternal trees. As the species is highly distributed throughout the Amazon Forest, samples must include the largest number of population in order to conserve as much genetic diversity as possible, thus maintaining a large effective population size of several hundred individuals.

References

- Austerlitz F and Smouse PE, 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between pollen dispersal and inter-female distance. *Genetics* 157:851-857.
- Azevedo VCR, Vinson CC and Ciampi AY, 2005. Twelve microsatellite loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian timber species. *Molecular Ecology Notes* 5:13-15.
- Boshier DH, 1995. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae) in French Guiana. *Heredity* 9:72-82.
- Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A and Bouvet JM, 2005. Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian. *Molecular Ecology* 14:1979-1989.
- Brondani RPV and Gattapaglia, D, 2001. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA Standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* 4(31):2-5.
- Cardoso SRS, Eloy NB, Provan J, Cardoso MA and Ferreira PCG, 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9:1753-1760.
- Ciampi AY, Brondani RPV and Grattapaglia D, 2000. Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites para *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Copaíba)-Leguminosae-Caesalpinioideae e Otimização de Sistemas Fluorescentes de Genotipagem Multiloco. *Boletim de Pesquisa, Embrapa Cenargen, Brasília DF*, 16:1-40.
- Cockerham CC, 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23:72-84.

- Collevatti RG, Grattapaglia D and Hay JD, 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliensis*, and endangered tropical tree species. *Heredity* 86:60-67.
- Dayanandan S, Dole J, Bawa J and Kesseli R, 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology* 8:1585–1592.
- Degen B, Petit R and Kremer A, 2001. SGS—Spatial Genetic Software: A Computer Program for Analysis of Spatial Genetic and Phenotypic Structures of Individuals and Populations. *The Journal of Heredity* 92(5):447-449.
- Degen B, 2003. Spatial Genetic Software (SGS), version 1.0d. <http://korov.cirad.fr/genetique>.
- Dick CW, 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences* 268:2391-2396.
- Dick CW, Etchelecu G and Austerlitz F, 2003. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and Africa honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology* 12:753-764.
- Diniz-Filho, JAF and Telles, MPC, 2001. Spatial Autocorrelation Analysis and the Identification of Operational Units for Conservation in Continuous Populations. *Conservation Biology* 16(4):924-935.
- Doyle JJ and Doyle JL, 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Dyer, RJ and Sork VL, 2001. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* 10:859-866.
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JW, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.

- Ferraz IDK, Leal-Filho N, Imakawa AM, Varela VP and Pina-Rodrigues FCM, 2004. Características básicas para um agrupamento ecológico preliminar de espécies madeiras da floresta de terra firme da Amazônia Central. *Acta Amazônica* 34(4):621-633.
- Hamrick JL, 1993. Influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* 107/108:281-297.
- Hardy, O. J. and X. Vekemans, 2002. SPAGeDi : a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2:618-620.
- Hardy OJ, Maggia L, Bandou E, Breyne P, Caron H, Chevallier MH, Doligez A, Dutech C, Kremer A, Latouche-Hallé C, Troispoux V, Veron V and Degen B, 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology* 15:559-571.
- Kanashiro M, Thompson IS, Yared JAG, Loveless MD, Coventry P, Martins-da-Silva RCV, Degen B and Amaral W, 2001. Improving conservation values of managed forests: The Dendrogene Project in the Brazilian Amazon. *Unasylva* 209.
- Lemes MR, Gribel R, Proctor J and Grattapaglia D, 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* king, meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at macrosatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology* 12:2875-2883.
- Lewis PO and Zaykin D, 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J and Graham C, 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82(11):1420-1425.

- Machado FRB, Vinson CC, Silva VP and Ciampi AY, 2002. Extração de DNA genômico de câmbios de espécies madeireiras tropicais. In: 53º Congresso Nacional de Botânica, 2002 July, 22 a 26, Recife, PE, Ed. Sociedade Brasileira de Botânica.
- Martins K, Chaves LJ, Buso GSC and Kageyama P, 2006. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. Conservation Genetics DOI 10.1007/s10592-006-9140-y.
- Matos DMS and Watkinson AR, 1999. The fecundity, seed, seedling ecology of edible palm *Euterpe edulis* in southeastern Brazil. Biotropica 30(4):595-603.
- Missiaggia AA and Grattapaglia D, 2006. A method for microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple tailed primers. Genetics and Molecular Research 5:72-78.
- Murawski DA, 1995. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspectives. In: Lowman MD and Nadkarni NM. Forest canopies. Academic Press New York; p. 457-493.
- NASA, U.S. Geological Survey. data: 30/07/2001. Landsat ETM+, WRS-2, 227/062, Composição RGB – 4-5-3, Nivel 1G . Sioux Falls, South Dakota: USGS.
- Nason JD and Hamrick JL, 1997. Reproductive and Genetic Consequences of Forest Fragmentation: Two Case Studies of Neotropical Canopy Trees. Journal of Heredity 88:264-276.
- Novick RR, Dick CW, Lemes MR, Navarro C, Caccone A and Bermingham E, 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. Molecular Ecology 12:2885-289.
- Reis MS, Guerra MP and Nodari RO, 1997. Management of natural populations and maintenance of genetic diversity of *Euterpe edulis*, the heart-of-palm tree. In: Bruns S,

- Mantell S, Tragardh C and Viana AM. Recent advances in biotechnology for tree conservation and management. Estocolmo, Sweden; p.145-156.
- Ribas LA and Kageyama PY, 2004. Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) B. considerando diferentes estádios de vida. *Scientia Forestalis* 65:176-187.
- Ritland K and Jain S, 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. *Heredity* 47:35-52.
- Ritland K, 1989. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43:848-859.
- Ritland K. 2002. Multilocus mating system program MLTR. Version 3.0. University of British Columbia, Canada. Available from: <http://kritland@interchange.ubc.ca>.
- Sampson JF, 1998. Multiple parternity in *Eucalyptus rameliana* (Myrtaceae). *Heredity* 81: 349-355.
- Sebbenn AM, Seoane CES, Kageyama PY and Vencovsky R, 2000a. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). *Scientia Florestalis* 58:127-143.
- Sebbenn AM, Kageyama PY, Siqueira ACMF and Zanatto ACE, 2000b. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: Implicações para a conservação e o melhoramento genético. *Scientia Forestalis*, 58:25-40.
- Sebbenn AM, 2003. Tamanho efetivo para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. *Revista Instituto Florestal*, São Paulo 15:147-162.
- Smouse PE, Dyer RJ, Westfall RD and Sork VL, 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete Heterogeneity among females. *Evolution* 55:260-271.

- Sokal, RR and Jacquez GM, 1991. Testing inferences about micro-evolutionary processes by means of spatial autocorrelation analysis. *Evolution* 45:152-168.
- Sokal RR and Oden NL, 1978. Spatial autocorrelation in biology. A methodology. *Biological Journal of the Linnean Society* 10:199-228.
- Veríssimo A, Uhl C, Mattos M, Brandino S and Vieira I, 1996. Impactos sociais, econômicos e ecológicos da exploração seletiva de madeiras numa região de fronteira na Amazônia Oriental: o caso de Tailândia. In: Veríssimo A and Barros AC. A expansão da atividade madeireira na Amazônia: impactos e perspectivas para o desenvolvimento do setor florestal no Pará. IMAZON, Belém PA. p. 09-46.
- White G and Powell W, 1997. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliceae family. *Molecular Ecology* 6:1995-1997.
- Young A, Boyle T and Brown T, 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11:413-418.

Figure 1. Localization of the study area at the National Forest of Tapajós, in the state of Pará, Brazil, from NASA. Distribution of the adult individuals at the 200 ha in the Brazilian Amazon, at FLONA Tapajós.

Figure 2. Correlograms of the Spatial Genetic structure of *M. huberi*. A) Index I Moran correlograma; B) Coancestry coefficient correlograma, Loiselle *et al.*, (1995).

Table 1. Main features of the microsatellite markers.

Loci	Repeat motif	Primer Sequence (5' – 3')	Allele range size (bp)	N° ind.	T_m °C	<i>A</i>	<i>f</i>	<i>F</i>
Mh04	(CT) ₁₂	F: GCACTCTCCATGGTTCCAGT R: AAAGAGTCAATGGCGTGAGC	187-225	1093	51	18	0.170	0.210
Mh06	(GA) ₁₄	F: ACACGCACAAAACAAACCAA R: TTCTTGAAGGAGGGTTGCTC	178-210	1065	53	24	0.233	0.237
Mh08	(CT) ₁₁	F: GTAATGGGAGCCGTTTGAGA R: CTGGGTAGCATTGTGTCAT	194-226	1098	53	17	0.103	0.142
Mh17	(CT) ₁₃	F: CACGATGACCTCTCAGTGGA R: CCTGTGTATGCGTTTCGATTG	240-282	1054	53	24	0.128	0.136
Mh19	(CT) ₂₁	F: AATTACAACCAAAGCTCCACTT R: TGAGAGTCTTTTCGCACTTCA	162-198	1096	53	22	0.405	0.424
Mh20	(GA) ₁₃	F: GAAGTTTTGACCATTGGAAT R: GACATAACACTAACCCCTTCACGA	152-194	1034	53	22	0.217	0.224
Mh22	(CT) ₁₅	F: CCCATTATAGCCCTCCACCT R: AGAGAGCACATGCAAGCTCA	186-218	1099	53	17	0.307	0.371
Mean						20.57	0.222	0.249
Upper							0.301	0.330
Lower							0.154	0.178

N° ind. Total number of individuals analyzed from both generations; *A* allele number, *f* **intrapopulation**

fixation index within generation, *F* **overall** fixation index for all individuals. CI 99%

Table 2. Genetic diversity parameters estimated for both generations with seven microsatellite marker loci.

Locus	<i>n</i>	<i>A</i>	H_e	H_o	<i>f</i>
<i>Adults</i>					
Mh04	294	17	0.840	0.769	0.084
Mh06	288	18	0.864	0.761	0.120
Mh08	294	17	0.863	0.786	0.090
Mh17	276	20	0.890	0.736	0.174
Mh19	294	17	0.884	0.636	0.281
Mh20	280	20	0.894	0.671	0.249
Mh22	294	15	0.759	0.585	0.229
Mean	288.7	17.7	0.856	0.706	0.175
99% C.I. Upper bound					0.222
99% C.I. Lower bound					0.121
<i>Progeny</i>					
Mh04	799	14	0.711	0.564	0.206
Mh06	777	24	0.865	0.627	0.275
Mh08	804	15	0.854	0.762	0.107
Mh17	778	22	0.861	0.766	0.111
Mh19	802	17	0.841	0.460	0.453
Mh20	754	21	0.879	0.699	0.205
Mh22	805	14	0.759	0.504	0.336
Mean	788.4	18.1	0.824	0.626	0.240
99% C.I. Upper bound					0.324
99% C.I. Lower bound					0.156

A allele number, H_e expected heterozygosity (gene diversity), H_o observed heterozygosity,

f intrapopulation fixation index. CI 99%.

Table 3. Mating system parameters for *Manilkara huberi*

Parameter	Estimate
t_m	0.995 (0.003)
t_s	0.718(0.012)
$t_m - t_s$	0.277(0.012)
$r_{p(m)}$	0.169(0.010)
$r_{p(s)}$	0.197(0.022)
$1 / r_{p(m)}$	5.9

t_m multilocus outcrossing rate, t_s single-locus outcrossing rate, $t_m - t_s$ biparental inbreeding, $r_{p(m)}$ paternity correlation, $r_{p(s)}$ self-pollination correlation, $1 / r_{p(m)}$ number of pollen donors per mother-tree. Standard errors through 1,000 bootstraps over families are in parentheses ().