



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MATAMATÁ-AMARELO (*Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

ANDREA BARROSO AMANCIO

MANAUS-AM

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ANDREA BARROSO AMANCIO

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MATAMATÁ-
AMARELO (*Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. MORI) UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
do Amazonas, como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutora
em Biotecnologia, área de
concentração Biotecnologias para a
Área Agroflorestal.**

Orientadora: Dra. DORIANE PICANÇO RODRIGUES

Co-Orientador: Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO

MANAUS/AM

2011

Ficha Catalográfica

(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UFAM)

Amancio, Andrea Barroso

XXX

Análise da diversidade genética em populações de matamatá-amarelo (*Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. MORI) utilizando marcadores microsatélites / Andrea Barroso Amacio. – Manaus: UFAM, 2011.

XXX f.;II.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2006.

Orientadora: Prof. Dra. Doriane Picanço Rodrigues

Co-Orientador: Spartaco Astolfi Filho

1.Microsatélite 2.Espécie florestal 3.Variação genética 4.Divergência genética 5.Isolamento por distância I.Título.

Este trabalho foi viabilizado com a parceria:

Bolsa de estudo concedida pela:

CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Apoio financeiro:

PROCAD-Amazônia INPA/UNICAMP/UFRGS/CAPES (023/2006)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/CT-Amazônia
(575588/08-0)

Execução do trabalho:

Universidade Federal do Amazonas- Laboratório de Evolução Aplicada - LEA

Autorização para coleta e transporte de material biológico concedida pelo:

IBAMA/MMA- N° 2514104



“Há uma só religião, a religião do amor. Há uma só linguagem, a linguagem do coração. Há uma só raça, a raça da humanidade. Há somente um Deus, e ele é onipresente”.

Sathya Sai Baba



Dedico esta Tese, em especial, a Sra. Etelvina († 11/05/1990), mãe protetora, amável e atenciosa que apesar de ter estado neste mundo somente até a minha adolescência, muito contribuiu para eu ter chegado até aqui. Embora não soubesse ler direito, nunca permitiu que eu brincasse, sem antes ter revisado a lição da escola comigo. Obrigada!

À minha irmã Anete, pessoa justa, íntegra e amante das comunidades tradicionais da Amazônia.

À majestosa Floresta Amazônica, com seus tons de verde intensos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dra. Doriane Picanço Rodrigues e Dr. Spartaco Astolfi Filho pelo incentivo, dedicação e motivação para que esse trabalho se realizasse. Em especial, a Dori pela paciência, pelas idas à bancada e principalmente pela amizade concedida durante esses quatro anos que trabalhamos juntas. Obrigada Dorica!

A Universidade Federal do Amazonas que me recebeu de portas abertas durante os 15 anos que lá estive, por todos os conhecimentos transmitidos, pelas grandes amizades que dentro deste meio eu fiz, pelos mestres da Engenharia Florestal, Biologia e Agronomia que contribuíram muitíssimo para o meu sucesso. Obrigada UFAM !

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Curso de Biotecnologia, em especial ao Dr. José Odair pela contribuição financeira dada para o prosseguimento da minha pesquisa.

Ao Dr. Charles Clement pela oportunidade de incluir meu trabalho no grupo CT Amazônia.

Aos Doutores Luis Antonio de Oliveira, Maria Teresa, Julio Tello e Eduardo Coutinho (*in memoriam*), pela amizade, paciência e confiança a mim concedida.

Aos identificadores botânicos Silo e Pedro Marinho pela coleta preciosa do matamatá.

A Miriam pela grande amizade e por ter concedido a oportunidade da coleta do matamatá dentro da floresta da AmBEv.

Aos que contribuíram para a construção da biblioteca genômica, Tatiana Menicucci, Miriam Raphael, Maria Zucchi, Carlos André e Anete Pereira.

Ao amigo Alessandro pelo protocolo bem sucedido à genotipagem no ABI e principalmente pela contribuição nas análises genéticas.

Aos amigos do Curso de Biotecnologia Francisca Holanda, Márcia Neiva, Dina, Jhonson, André, Rogério, Fred, Elzimar, Nubiane, Dona Regina, Simone e Agatha pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Evolução Aplicada Karine, Vanessa, Idrielly, Gabriel, Michelly, Ederly, Rodrigo, Djair, Laura, Daniela, Marcicleide, Salvador, Valdemir e Sônia, pelos momentos agradáveis de convivência, além dos conselhos acadêmicos e pessoais que fizeram os dias de trabalhos mais divertidos e felizes. É impossível desvincular meu êxito da troca de experiência e dos doces momentos de descontração que passamos juntos dentro e

fora do ambiente de trabalho.

Aos novos amigos da GECEF/IPAAM, em especial: Liliane, Cristiano, Danielle Gonçalves, Eduardo Silva e Rodrigo Serafini pelo apoio no início dessa nova fase da minha vida e pela motivação em fazer eu dividir o meu tempo em escrever a tese e os processos.

Aos meus amigos externos ao meu trabalho, Zulma, Edyeime, Daniela Barros, Francivane, Rafael, Ana Cristina, Jackeline, Stephane, Quésia, Remy, Marcelo e Elaine Batista pelos momentos constantes de alegria e felicidade.

As minhas amigas Fabulosas Enésia, Duka, Aldi, Eyde e Alexandra pela força, apoio, conselhos e com quem posso contar em todas as adversidades.

A minha Família, Anete, Sebastião, Antônio, Txapuã, Whefaxi, Taiguara, Ditzel, Txaiá, Dimmy, Thiago e Beatriz pelo carinho e amor. Tudo o que sou e tudo aquilo que eu poderei alcançar é fruto da cumplicidade e apoio da minha família.

Ao Yoann Gorska, pela paciência, incentivo, carinho, companheirismo, dedicação e principalmente pelo amor a mim dado. Obrigada meu YoYo!

Enfim, a todos aqueles que aqui não foram citados mais foram fundamentais nessa fase da minha vida.



“Convém não esquecer, contudo, que a realização nobre exige três requisitos fundamentais, a saber: primeiro, desejar; segundo, saber desejar; e, terceiro, merecer, ou, por outros termos, vontade ativa, trabalho persistente e merecimento justo”.

Chico Xavier



SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO	1
1. REFERENCIAL TEÓRICO	4
1.1. A espécie <i>Eschweilera coriacea</i> (Dc.) S.A. Mori.....	4
1.2. Ocorrência da espécie	4
1.3. Biologia reprodutiva	7
1.4. Importância econômica	9
1.5. Marcadores moleculares	10
1.6. Marcadores microsátélites	12
1.7. Variabilidade e Estrutura Genética em populações naturais	15
2. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF 12 MICROSATELLITE MARKERS FROM THE TROPICAL TREE <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori D CROSS-GENERA AMPLIFICATION WITHIN THE LECYTHIDACEAE.....	22
3. DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE MATAMATÁ-AMARELO (<i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori) COM MARCADORES MICROSSATÉLITES.	28
RESUMO.....	28
DIVERSITY AND GENETICS STRUCTURE IN NATURAL POPULATION OF MATAMATÁ-AMARELO (<i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori) WITH MICROSSATELLITES.....	29
ABSTRACT	29
3.1. INTRODUÇÃO	30

3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.2.1. Locais de coleta.....	33
3.2.2. Caracterização dos indivíduos coletados.....	34
3.2.3. Material vegetal e extração de DNA	34
3.2.4. Amplificação dos locos microssatélites.....	35
3.2.5. Análise dos dados Genéticos.....	36
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.3.1. Diversidade alélica dos locos microssatélites.....	39
3.3.2. Diversidade genética populacional	47
3.3.3. Estrutura genética populacional.....	48
3.4. CONCLUSÃO	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXO 1 - CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	
ANEXO 2 - INVENTÁRIO DAS POPULAÇÕES COLETADAS	
ANEXO 3 - CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS COLETADOS	

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1	
FIGURA 1. A) Tronco da árvore de <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori num fragmento florestal da BR-429 no Estado de Rondônia. B) Rebrotamento a partir do tronco cortado. C) Fruto maduro da <i>E. coriacea</i> . D) Frutos e sementes da <i>E. coriacea</i> . E) Emergência da parte aérea em viveiro. F) (i) jovens e (II) adultos ampliadas. G) Exsicata da <i>E. coriacea</i> . H) Inflorescência. A e B – Fotos de Andrea Amancio; C, D e F – Fotos de Camargo <i>et al.</i> (2008); G – Fotos de www.findingspecies.org ; H – Fotos de Ribeiro <i>et al.</i> (1999).....	5
FIGURA 2. Distribuição geográfica da <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori na Bacia Amazônica.....	6
FIGURA 3. Composição do Índice de Valor de Importância – IVI para as espécies com os maiores valores de IVI no parque fenológico da EMBRAPA (Fonte: SILVA <i>et al.</i> , 2008)..	7
CAPÍTULO 3	
FIGURA 1. Localização das áreas de coleta de <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori nos Estados do Amazonas e Rondônia.....	33
FIGURA 2. Histograma de distribuição das frequências alélicas de nove locos microssatélites em amostras de seis populações de <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori.....	40
FIGURA 3. Agrupamentos populacionais identificados pelo programa STRUCTURE com base em nove locos microssatélites de <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori (ΔK com K 2 a 12 com 10 simulações).....	49

- FIGURA 4. Probabilidade de associação das 195 plantas em dois grupos identificados pelo programa STRUCTURE ($\Delta K = 2$) para seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori com base em nove locos microsátélites. As cores representam os grupos com similaridades alélicas e cada planta (linha vertical) é avaliada em termos da probabilidade de compor um determinado grupo.....49
- FIGURA 5. Dendrograma de distância de NEI (1978) agrupado por UPGMA, para seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A Mori (Teste de bootstrap de 10000 simulações, implementado pelo programa TFPGA).....50

LISTA DE TABELAS

	Página
 CAPÍTULO 2	
TABLE 1. Locus names, GenBank accession numbers, repeat motifs, optimized annealing temperatures (Ta), primer sequences, number of alleles (A), allele sizes of 12 microsatellite loci from <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori.....	25
TABLE 2. Cross-species amplification of 12 microsatellite loci created for <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori in three species of Lecythidaceae.....	26
 CAPÍTULO 3	
TABELA 1. Classificação do número de alelos de acordo com sua frequência e distribuição entre amostras de seis populações de <i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S.A. Mori, considerando nove locos microssatélites.....	42
TABELA 2. Índices de diversidade genética, coeficiente de endogamia e diferenciação genética para seis populações de <i>Eschweilera coriacea</i> (CD.) S.A. Mori com base na variação de 9 locos microssatélites. <i>A</i> - Número de alelos; <i>P</i> - Número de alelos privados; <i>H_O</i> - Heterozigosidade observada; <i>H_E</i> - Heterozigosidade esperada; <i>f</i> - Coeficiente de endogamia de Weir e Cockerham (1984); <i>H_T</i> - Diversidade genética total; <i>H_S</i> - Diversidade genética na população; <i>G_{ST}</i> – Estimador da diferenciação genética de Nei; <i>R_{ST}</i> - Estimador de diferenciação genética (stepwise mutation model – SMM);	

* H_O - significativamente diferente de H_E a $p < 0,05$. * F_{IS} - não diferente de zero a $p > 0,05$ 44

TABELA 3 Matriz de divergência (FST – diagonal abaixo) e fluxo gênico [M(número absoluto de migrantes) = $2Nm$ - diagonal acima] entre seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori, considerando nove locos microssatélites..... 52

RESUMO

O matamatá-amarelo, *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori é uma espécie florestal nativa da região tropical, utilizada principalmente na indústria madeireira para a fabricação de postes, mourões e esteios, além de ser utilizado em construções navais. A espécie apresenta constituintes com atividades farmacológicas antifúngicas e anti microbianas e compostos químicos que podem atuar como agentes antioxidantes. Este trabalho avaliou a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *E. coriacea*, usando nove locos microssatélites desenvolvidos por meio de uma biblioteca genômica enriquecida. Dos 96 clones positivos sequenciados, 81 apresentaram sequências repetidas, dos quais 49 (65%) foram apropriadas para o desenho dos primers nas regiões flanqueadas, e 24 sequencias foram selecionadas para os desenhos dos pares de primers usando o Programa Oligo Explorer. Doze primers microssatélites amplificaram e foram polimórficos, dos quais nove foram usados para estimar os parâmetros genéticos de seis populações de matamatá-amarelo sendo: ao longo da Rodovia BR-429, Rondônia-RO (n=31), Fragmento Florestal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) - Manaus-AM (n=36), Reserva Adolpho Ducke, Manaus-AM (n=32), Fazenda Experimental da UFAM, Coari-AM (n=33), Fazenda Santa Helena e Ilha de Vera Cruz, Maués-AM (n=35) e Vila Amazônia, Parintins-AM (n=35). Existe alta variabilidade genética para os genótipos de *E. coriacea*, com média de 16,2 alelos por locos e diversidade total (H_T) igual a 0,77. Os nove locos apresentaram 14 alelos comuns e 30 alelos intermediários, 102 alelos raros, sendo 41 privados, 47 esporádicos e 14 difundidos. As estimativas de heterozigosidade observadas (H_O) foram menores que 0,5 para maioria dos locos, variando de 0,07 (Ec15) a 0,75 (Ec36). As heterozigosidades esperadas (H_E) variaram de 0,13 (Ec15) a 0,92 (Ec24). Os valores de H_O foram inferiores aos valores de H_E na maioria dos locos, com exceção dos locos Ec37 na população de Rondônia. Diferenças claras entre H_O e H_E para maioria dos locos indicam deficiências de heterozigotos. O teste exato de Fisher revelou que 85,2% dos locos não aderem o EHW no conjunto de populações. Os coeficientes de endogamia (f) variaram entre populações, sendo maior na Reserva Ducke (0,53) e menor na UFAM (0,29), com média de 0,4, evidenciando endogamia nas populações. O número de alelos para todos os locos foi maior nas populações de Maués (105) e menor em Rondônia (54). Os altos índices de diversidade estimados pelas H_E e H_O foram semelhantes para a maioria das populações, variando entre 0,33/0,44 (H_O/H_E) a 0,46/0,83 (H_O/H_E), sendo a H_O

menor na população de Rondônia e maiores na UFAM e Parintins e H_E menor para a população de Rondônia e o maior para Maués. A AMOVA detectou 87,5 % do total da variação dentro das populações e 12,5%. Detectou-se baixa diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações Parintins e Maués (0,018), seguida da UFAM e Reserva Ducke (0,030), certamente devido ao alto fluxo gênico ($Nm=13,4$; 8,1, respectivamente). Este relacionamento foi confirmado pelo dendrograma de distância genética de NEI (1978), o qual evidencia dois grupos, um formado pelas populações de UFAM/Reserva Ducke e Parintins/Maués, e o segundo por Rondônia e Coari, assim como detectado pelo Programa STRUCTURE. O teste de Mantel revelou relação entre distância geográfica e distância genética, indicando isolamento por distância. Os resultados indicam que os nove locos microssatélites foram eficientes em avaliar a diversidade genética nas seis populações de *E. coriacea*, mostrando que a maior parte da variação genética é encontrada dentro das populações e que a moderada estrutura genética encontrada entre, pode ser explicada pelo isolamento por distância, possivelmente associada aos padrões de reprodução e demografia da população.

Palavras-chave: microssatélite, espécie florestal, variação genética, divergência genética, isolamento por distância.

ANALYSE GENETIC DIVERSITY IN MATAMATÁ-AMARELO (*Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori) POPULATIONS USING MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

The matamatá-amarelo, *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori, is a native forest species from rain forest mainly used for timber specifically for producing mainstays, poles and fenceposts and also ship factories. The species components are fungicide and antimicrobial and antioxidant chemicals. This work evaluated diversity and genetic structure of natural populations of *E. coriacea*, using nine microsatellite loci developed through an enriched genomic library. Of the 96 positive clones sequenced, 81 contained repetitive sequences, of which 49 (65%) were appropriate for design of primers in the flanking regions and 24 sequences were selected for primer pair design using the Software Primer 3. Twelve microsatellite primers amplified and were polymorphic, being nine used to estimate genetic parameters of six populations of matamatá-amarelo as follows: Highway BR-429, Rondônia-RO (n=31), Federal University of Amazonas State (UFAM) - Manaus-AM (n=36), Adolpho Ducke Reserve, Manaus-AM (n=32), Experimental Farm of the Federal University of Amazonas State (UFAM), Coari-AM (n=33), Santa Helena Farm and Ilha de Vera Cruz, Maués-AM (n=35) and Vila Amazônia, Parintins-AM (n=35). There is a great genetic variability for the genotypes of *E. coriacea*, with mean of 16,2 alleles per loci and total diversity (H_T) equal to 0,77. Nine loci presented 14 common alleles and 30 intermediate-frequency alleles, 102 alleles scattered among population, being 41 private, 47 sporadic and 14 spread out. The observed estimates of heterozygosity (H_O) were smaller than 0,5 for most loci, varying from 0,07 (Ec15) to 0,75 (Ec36). The expected estimates of heterozygosity (H_E) varied from 0,13 (Ec15) to 0,92 (Ec24). The values of H_O were smaller than the values of H_E in most loci, except loci Ec37 in Rondônia population. Differences between H_O and H_E for most loci indicate deficiency of heterozygote. The Fischer test showed that 85,2% of loci do not join the HWE the populations. The coefficients of inbreeding (f) varied between populations, being larger in Ducke Reserve (0,53) and smaller in UFAM (0,29), with mean of 0,4, showing inbreeding in populations. The number of alleles for all loci was larger for the Maués population (105) and smaller in Rondônia (54). The high index for diversity estimated by H_E e H_O were similar to most populations, varying between 0,33/0,44 (H_O/H_E) and 0,46/0,83 (H_O/H_E), being the H_O smaller in Rondônia population and larger in UFAM and Parintins and H_E smaller in the Rondônia population and larger for Maués. The AMOVA

detected 87,5 % of total variation inside populations and 12,5%. Genetic differentiation was detected (F_{ST}) between populations of Parintins and Maués (0,018), followed by UFAM and Ducke Reserve (0,030), certainly due to the high gene flow ($Nm = 13,4; 8,1$, respectively). This relation was confirmed by dendrogram of genetic distances of NEI (1978), which shows two groups, one formed by formed by UFAM/Reserva Ducke and Parintins/Maués populations, followed by Rondônia and Coari, as detected by the STRUCTURE Program. The Mantel test showed relation between geographic and genetic distance, showing distance isolation. The results indicate that nine microsatellite loci were efficient in evaluating genetic diversity in six populations of *E. coriacea*, showing that most genetic variation is found inside populations and the mild genetic structure was found between populations, being explained by distance isolation, possibly associate to mating patterns and population demography.

Key-words: microsatellites, forest species, genetic variation, genetic divergence, distance isolation.

INTRODUÇÃO

A espécie florestal *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori, pertencente à Família Lecythidaceae, é uma árvore nativa da região tropical encontrada desde o leste do Panamá, englobando todos os países que fazem parte da Bacia Amazônica. No Brasil é popularmente conhecida como matamatá-amarelo, matamatá-branco, matamatá-preto ou morrão vermelho. Quando adulta pode atingir mais de 37 m de altura, sendo uma árvore decídua de dossel a subdossel, e destaca-se por sua distribuição agregada, apresentando elevada densidade populacional nas áreas de ocorrência (MORI & PRANCE, 1990).

Apresenta-se como uma espécie arbórea de importância econômica na região Amazônica pelo interesse que vem despertando nas indústrias madeireiras e biotecnológicas. Sua madeira apresenta resistência mecânica, durabilidade natural e densidade, permitindo o uso para a fabricação de dormentes, moirões, cavacos para cobrir casas, construções portuárias e postes para a rede elétrica, além de ser utilizada como fonte de celulose e papel (LOUREIRO *et al.*, 1979). O extrato pode ser utilizado para fins farmacológicos (YANG *et al.*, 1998), podendo atuar como agentes antioxidantes, além de inibir o crescimento de organismos patogênicos (FREITAS *et al.*, 2005). Ainda, com finalidade menos nobre, poderia ser utilizada para a produção de carvão e lenha.

Apesar das várias características favoráveis ao aproveitamento do lenho de *E. coriacea*, o tradicionalismo existente no setor madeireiro, seja através do investidor como do consumidor, limita a introdução de novas espécies no mercado. Paralelo a isso, o desconhecimento de tecnologias para o corte de madeiras duras, influencia a exaustiva repetição da escolha das mesmas espécies para serem comercializadas (MADY, 1998). Como é o caso da acariquara (*Minquartia guianensis* Aubl.) espécie utilizada na forma de postes e esteios que sofre superexploração devido à alta qualidade de sua madeira (FRANKHAN *et*

al., 1999). Uma alternativa para minimizar os impactos decorrentes da exploração nessa espécie seria utilizar a madeira de matamatá-amarelo em substituição à das acariquaras, já que possui elevada representatividade em estudos fitossociológicos e uma excelente distribuição nos diferentes ecossistemas amazônicos (MADY, 1998).

Em populações naturais de espécies arbóreas, a recente fragmentação florestal aliada à exploração madeireira tem sido a principal ameaça à sustentabilidade dos ecossistemas florestais, aumentando as possibilidades de erosão genética decorrente da drástica redução do tamanho populacional (CASTELLEN, 2005). Este fato, aliado ao isolamento das populações numa matriz pouco permeável, gera condições propícias para a intensificação dos efeitos da deriva, diminuição do fluxo gênico entre populações, aumento da endogamia e isola reprodutivamente indivíduos que contém uma pequena amostra do conjunto gênico da população original, podendo causar, em curto prazo, contínua perda de alelos.

Nesse sentido, estudos genéticos de espécies florestais como o matamatá-amarelo, são essenciais para que sejam direcionadas práticas de manejo que visem à conservação e utilização desse recurso de forma adequada, além de apontar medidas efetivas a minimização dos impactos que venham a ser originados com retirada dessa madeira. Estes estudos envolvem o sistema reprodutivo, o fluxo gênico, a distribuição espacial dos indivíduos e, principalmente, a variação genética entre e dentro das populações (KAGEYAMA, 1987).

Atualmente o uso de marcadores moleculares têm se revelado uma ferramenta eficiente e a cada dia mais acessível para descrever, estimar parâmetros de diversidade genética, estrutura genética das populações e fluxo gênico (ALVES, 2002). Dentre os marcadores eficientes para este fim, estão os marcadores microsatélites, os quais possuem características intrínsecas de marcador estável, codominante, neutro, multialélico, com elevada reprodutibilidade e confiabilidade, (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

No Brasil, ao longo das duas últimas décadas, iniciaram-se trabalhos de

desenvolvimento de microssatélites visando estudos populacionais de espécies florestais como *Swietenia humilis* (WHITE & POWELL, 1997), *Symphonia globulifera* (ALDRICH *et al.*, 1998), *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI *et al.*, 1999), *Euterpe edulis* Mart (GAIOTTO *et al.*, 2001), *Bactris gasipaes* Kunth (MARTINEZ *et al.*, 2002; BILLOTTE *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2007), *Swietenia macrophylla* King (LEMES *et al.*, 2002), *Ceiba petandra* (BRONDANI *et al.*, 2003), *Copaifera langsdorfii* (GONELA *et al.*, 2005), *Manilkara huberi* (Ducke) (AZEVEDO *et al.*, 2005), *Tabebuia aurea* (BRAGA *et al.*, 2006), *Araucaria angustifolia* (SCHMIDT *et al.*, 2007), *Casearia sylvestris* Sw. (CAVALLARI *et al.*, 2008) e *Hymenaea courbaril* L. (BUONAMICI *et al.*, 2008).

Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver marcadores microssatélites para *E. coriacea* e utilizá-los em estudos de diversidade e estrutura genética de populações de diferentes locais da Amazônia, gerando informações que poderão auxiliar em futuras estratégias de manejo e conservação da espécie.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A espécie *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori

A *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori tem sido geralmente identificada como *Eschweilera odora* (Poepp) Miers, que é uma sinonímia do primeiro. Carmagos *et al.*, (1995) relacionaram a sinonímia de *Eschweilera odora* e *Eschweilera matamata* Huber a *Eschweilera coriacea*. Em Mori & Prance (1990) consta ainda a sinonímia *Eschweilera coriacea* (A.P. de Candolle) Artius ex Berg.

No Brasil, a *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori é popularmente conhecida como matamatá-amarelo, matamatá-branco, matamatá-preto ou morrão vermelho. Em outros países da América do Sul são relacionadas diversas denominações para essa espécie: coco, cocomajagua (Colômbia); pokai-yek (Venezuela); bergi-mambarkla, hoogland-mambarklak epronmambarklak, kakaralli, Black kakaralli (Suriname); bailaaki, paramaka, mahot-Blanc, mohot-jaune, mahot-noir (Guiana Francesa); cashnum (Equador); machimango-Blanco e machimango colorado (Peru) (MORI & PRANCE, 1990; LOUREIRO *et al.*, 1979).

A *E. coriacea* é uma árvore que pode alcançar até 37 metros de altura e apresenta sapopemas em sua base (MORI & PRANCE, 1990). Possui fuste reto e cilíndrico, casca fibrosa, fina e persistente (Figura 1A). O ápice dos ramos novos é marrom acinzentado, subglabros. As folhas são oblongo-lanceoladas, acuminadas, de base redonda ou obtusa, margem íntegra, sempre verde, semicoriáceas, glabras, com vênulas e nervuras laterais ascendentes, unindo-se para a margem (Figura 1F). A inflorescência é racemosa apical ou nas axilas superiores, muitas vezes bastante ramificadas, brancas ou amareladas, com andróforo amarelo (Figura 1G e 1H). O fruto é grande variando de 3,7 a 6,4 cm de comprimento; 4,0 a 7,6 cm de largura; 3,9 a 7,1 cm largura da abertura e opercular; 33,5 a 119,4 g de peso, lenhoso, tipo

pixídio operculado, verde quando maduro. Formato globóide, com base truncada a levemente arredondada e ápice truncado e umbonado. Anel da calicina visível próximo à base ou na região mediana do fruto, saliente, com cinco a seis lobos triangulares e lenhosos (Figura 1C e 1D). As sementes são consideradas oleoginosas (LOUREIRO *et al.*, 1979).

A emergência da parte aérea no viveiro ocorre em 5 a 28 dias e a formação da plântula cerca de sete dias depois. O caule se alonga com alguns catáfilos, fica temporariamente inclinado próximo à gema apical e duas folhas alternas expandem-se simultaneamente. As folhas jovens são inicialmente arroxeadas e contrastam com o caule verde (Figura 1E) (CARMARGO *et al.*, 2008).

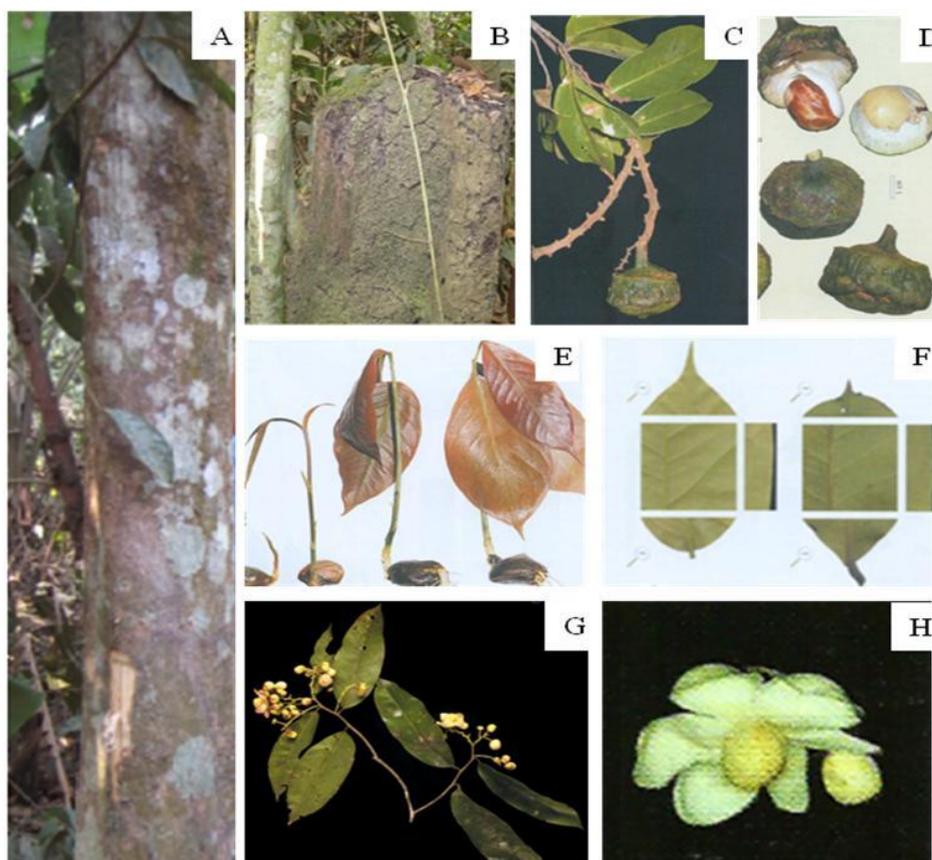


Figura 1. **A)** Tronco da árvore de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori num fragmento florestal da BR-429 no Estado de Rondônia. **B)** Rebrotamento a partir do tronco cortado. **C)** Fruto maduro da *E. coriacea*. **D)** Frutos e sementes da *E. coriacea*. **E)** Emergência da parte aérea em viveiro. **F)** (i) jovens e (ii) adultos ampliadas. **G)** Exsicata da *E. coriacea*. **H)** Inflorescência. A e B – Fotos de Andrea Amancio; C, D e F – Fotos de Camargo *et al.* (2008); G – Fotos de www.findingspecies.org; H – Fotos de Ribeiro *et al.* (1999).

1.2 Ocorrência da espécie

A *E. coriacea* ocorre em matas de terra firme, sobre solo argiloso ou argilo-arenoso (LOUREIRO *et al.*, 1979). Ocupam na maior parte o sub-bosque ou são árvores de dossel, mais abundantes em matas de terra firme das planícies tropicais ou das florestas úmidas. É também encontrada em áreas de várzea e distribui-se do leste do Panamá e noroeste da Colômbia, através das Guianas e toda bacia amazônica (Figura 2).

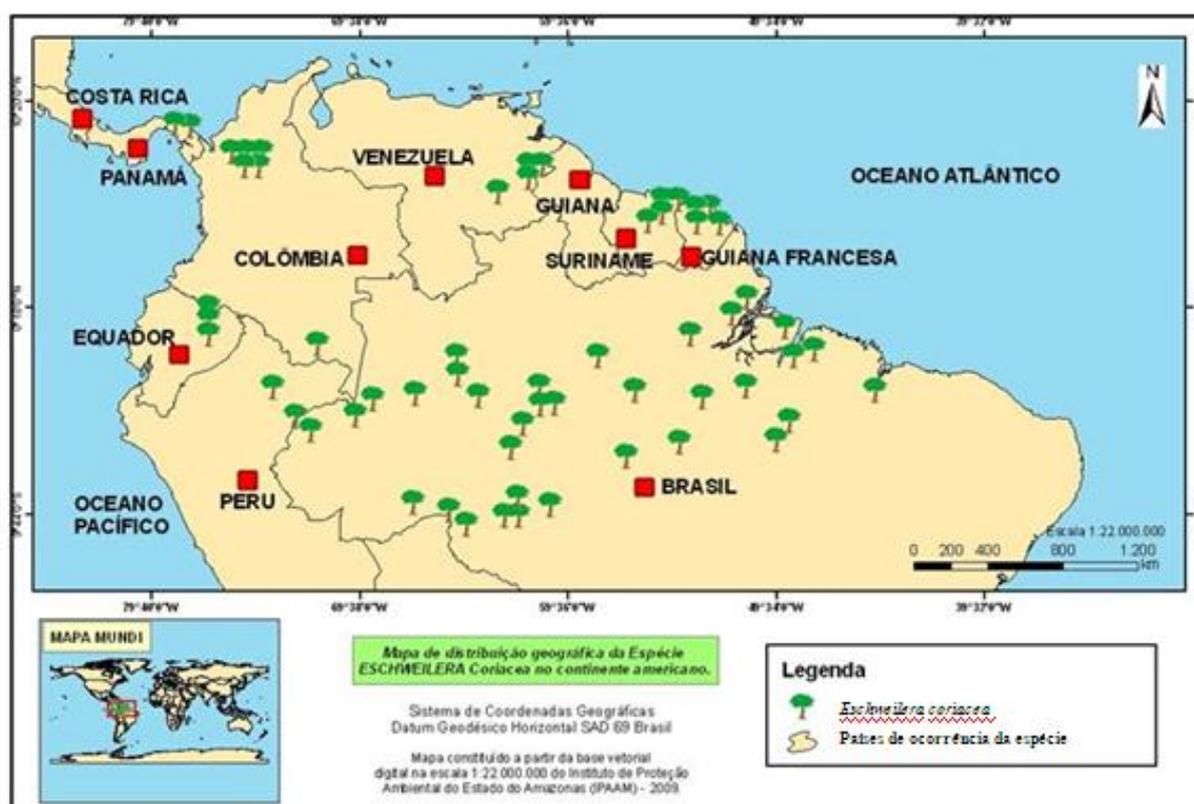


Figura 2. Distribuição geográfica da *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori na Bacia Amazônica.

É uma espécie que destaca-se por sua distribuição agregada, possuindo frequência muito alta (0.95) em floresta equatorial de terra firme. Fato confirmado por Tello (1995) que destacou a *Eschweilera coriacea* como a espécie mais abundante em uma topossequência da Reserva Florestal Adolpho Ducke, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, indicando também ser uma das espécies com melhor distribuição. Dados semelhantes foram encontrados por Amancio & Tello (2000) em um levantamento florístico realizado no fragmento florestal

do Campus da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus-AM. Segundo os autores, a família de maior cobertura e abundância foi a Lecythidaceae, sendo a *E. coriacea* a espécie mais importante encontrada nessa região. No grupo sucessional pode ser considerada espécie secundária tardia (AMARAL *et al.*, 2009).

Silva *et al.* (2008), trabalhando no parque fenológico da EMBRAPA Amazônia Ocidental, concluíram que a espécie mais importante nesta floresta, sob todos os índices calculados, foi a *Eschweilera coriacea* (Figura 03).

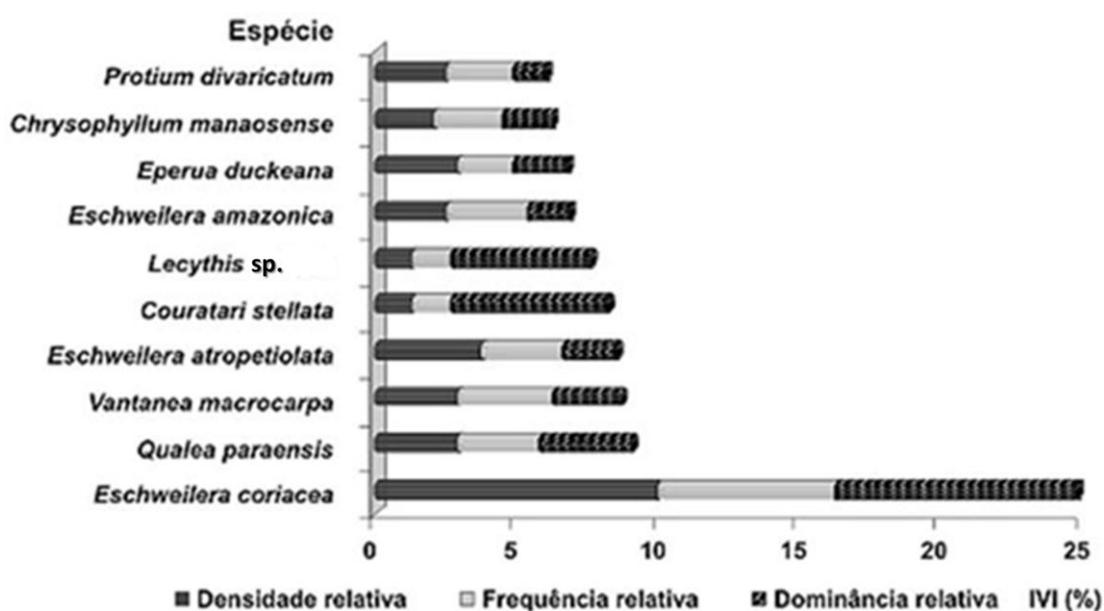


Figura 3. Composição do Índice de Valor de Importância – IVI para as espécies com os maiores valores de IVI no parque fenológico da EMBRAPA (Fonte: SILVA *et al.*, 2008).

1.3 Biologia reprodutiva

As flores de *E. coriacea* são hermafroditas (WATSON & DALLWITZ, 1992), polinizadas frequentemente por abelhas do gênero *Euglossinae*, que são atraídas através do aroma floral. Sua floração ocorre de agosto a dezembro nas Guianas, Amazônia e no oeste dos Andes. As flores tem sido verificadas de janeiro a setembro (MORI & PRANCE, 1990).

O mecanismo de dispersão das sementes de *E. coriacea* que contribui para a regeneração natural é a barocoria, e geralmente pode ser feita por animais do tipo macaco-aranha (*Ateles geoffroyi*), guariba (*Alouatta belzebul belzebul*), macacos-prego (*Cebus apella*), cuxius (*Chiropotes satanas*), papagaios (*Amazona* sp.). Suas sementes podem ser enterradas individualmente por pequenos roedores como cutias (*Dasyprocta aguti*) e esquilos (*Sciurus aestuans*). Quando os frutos são verdes, os roedores o descartam após inspeção, com isso as sementes são depositadas na vizinhança das árvores maternas (MORI *et al.*, 1978; MORI & PRANCE, 1990; STEVENSON, 2001).

Lopes (2008) em seu estudo sobre a dispersão de sementes e a estrutura de duas populações de *E. coriacea* na Amazônia oriental, verificou que a baixa taxa de dispersão de sementes aumenta o nível de agregação entre os indivíduos. Segundo o autor, é possível que as plântulas debaixo dos adultos estejam contribuindo mais para a formação das populações que as plântulas dispersadas para além da zona de projeção da copa dos adultos.

Contudo, não existem estudos do sistema de reprodução em *E. coriacea*, no entanto são muitas as evidências de que espécies da família Lecythidaceae sejam xenógamas, mas são poucos os trabalhos que testaram todos os sistemas reprodutivos, obtendo resultados mais precisos. Resultados sobre o sistema reprodutivo de *Eschweilera nana*, uma espécie do cerrado, sugerem que a espécie é exclusivamente xenógama, pois formam frutos a partir de polinização cruzada entre flores de indivíduos diferentes (POTASCHEFF, 2010). Também, de acordo com Gusson (2005), o sistema de reprodução de *Eschweilera ovata* é misto, com predomínio de cruzamentos e que, provavelmente, não existem mecanismos de auto-incompatibilidade na espécie, a maior parte da endogamia gerada foi por cruzamentos entre parentes, sendo o restante atribuído à autofecundação.

1.4 Importância econômica

A madeira da *E. coriacea* é pouco atacada por xilófagos e a não suscetibilidade ao ataque de brocas marinhas, o que a torna uma madeira adequada à exportação, cuja aplicação dá-se em marinas e construções portuárias de países litorâneos.

O valor encontrado para a resistência a choques (5,92 kg.m) indica o emprego na construção de carrocerias de caminhões e outras bases de suporte que necessite receber cargas de maneira abrupta (MADY, 1998). A resistência a compressão perpendicular às fibras (176 kg/cm² em madeira verde e 183 kg/cm² em madeira seca) permite justificar o uso da espécie para dormentes de linhas de trem. Em relação à compressão paralela, aplica-se muito bem a vigamentos de casas e construções em geral.

As características encontradas em *E. coriacea* (resistência mecânica, durabilidade natural e densidade) permitem sugerir várias finalidades para o emprego desta espécie na indústria florestal: dormentes, moirões, cavacos para cobrir casas, construções portuárias e postes para a rede elétrica (LOUREIRO *et al.*, 1979). Além de ser utilizada como fonte de celulose e papel. Como finalidades menos nobre, poderia ser utilizada para a produção de carvão e lenha.

Também de suas folhas e troncos podem ser extraídos compostos químicos com potencial biotecnológico, Yang *et al.* (1998) encontraram nas folhas de *E. coriacea* três composto bioativos: Eschweilenol (A), extraído junto a dois derivados de ácidos elágicos inativos, o Eschweilenol (B) e Eschweilenol (C) e outros compostos conhecidos por sacarose e 3 galloylepigallocatechin-O, com potencial anti-câncer. Ainda, Freitas *et al.* (2005) encontraram nas raízes da *Eschweilera* sp. elevado potencial para testes antifúngicos e suas folhas mostraram-se ativas aos testes antibacteriano. Fioratti *et al.* (2007) demonstraram que o extrato vegetal das folhas de *Eschweilera* sp. apresentou ação antioxidante, devido a presença de compostos fenólicos e flavonóides.

1.5 Marcadores moleculares

O desenvolvimento da biologia molecular tornou possível a manipulação do DNA através da utilização de técnicas para analisar os polimorfismos genéticos (BUSO *et al.*, 2003). Os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para pesquisas em melhoramento genético de animais e plantas e estudos de diversidade genética de populações, em especial aquelas com vista à conservação (CARNAVALE-BOTINA, 2006). Em outras palavras, a grande vantagem dos marcadores moleculares do DNA, com relação a outros tipos de marcadores, é a sua abundância, a sua insensibilidade aos fatores do ambiente e o fato do DNA estar presente em todas as células do organismo (RAGOT & HOISINGTON, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; VIANA *et al.*, 2003; BORÉM, 2006).

Durante a década de 60, os estudos genéticos eram realizados utilizando-se marcadores morfológicos de fácil identificação no organismo e geralmente regidos por um único gene (LEOI, 2003). Apesar dos marcadores terem contribuído significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica, o pequeno número de marcadores morfológicos diferentes em uma mesma linhagem diminui a probabilidade de se encontrar associações significativas entre esses marcadores e caracteres de importância para programas econômicos ou para estudos teóricos (BORÉM, 1998).

O primeiro grande passo para resolver estes problemas foi o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, que são baseados na análise do produto de expressão de genes. Eles revelaram-se como uma nova fonte de marcadores genéticos com inúmeras vantagens sobre os marcadores morfológicos. Exemplos da utilização desses marcadores foram apresentados em trabalhos com a *Trema micrantha* (L). Brume e *Cecropia* sp. (RIBAS, 2003), *Tabebuia cassinoides* (CAVALARRI NETO, 2004), *Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish (BARREIRA, 2005).

Com o desenvolvimento da técnica denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição), a partir da década de 70, foi possível detectar os polimorfismos por meio da visualização simultânea de centenas de fragmentos restritos de DNA (BORÉM, 2006; BITTENCOURT, 2008). Nessa técnica, o DNA de um indivíduo é clivado com enzimas de restrição e os fragmentos são separados de acordo com o seu tamanho, por eletroforese (VIANA *et al.*, 2003).

Em meados da década de 80, novos tipos de marcadores surgiram por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação da Cadeia da DNA Polimerase), que consiste em amplificar porções específicas do genoma, desde que as sequências em torno dessas regiões sejam conhecidas. Essa técnica é automatizada, pelo uso de um termociclador e de uma enzima DNA polimerase termoestável, a taq DNA polimerase.

Tomando os princípios da Polymerase Chain Reaction foi desenvolvido por Williams *et al.* (1990), a técnica de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA ou Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso*), que diferentemente do PCR clássico, não requer o conhecimento prévio da região a ser amplificada para o desenho dos ligonucleotídeos. Essa técnica utiliza um único primer mais curto, normalmente de dez nucleotídeos e de sequência arbitrária, para realizar a amplificação. Apesar de suas limitações essa técnica foi intensamente utilizada em trabalhos relacionados a banco de germoplasma de *Bactris gasipaes* Kunth (PICANÇO *et al.*, 1999; CRISTO-ARAÚJO, 2008); as diferenças genéticas da *Solanum crinitum* Lam em diferentes regiões da Amazônia (HOLANDA, 2010); análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* (ZUCCHI, 2002) e divergência genética em *Cedrela fissilis* Vell (ASSUNÇÃO, 2004).

Outra técnica, proposta por Vos *et al.* (1995) é a dos marcadores moleculares aflps (Amplified fragment length polymorphism) que exploram o polimorfismo baseado em

diferenças entre genótipos na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial de fragmentos decorrente da variação na posição de sítios de enzimas de restrição (milach, 1998). 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 (AZEVEDO, 2007). a principal limitação desta técnica, assim como a de rapd, é a impossibilidade de diferenciar genótipos heterozigotos dos homozigotos.

Os marcadores baseados em locos hipervariáveis de minissatélites e aqueles baseados na amplificação de microssatélites, surgiram em meados dos anos 80, após a descoberta que os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de sequências repetidas. Esses marcadores foram chamados de DNA satélite ou VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats ou Repetição em Tadem de Número Variável) e classificados em duas classes distintas, de acordo com seu tamanho, algumas mais complexas (minisatélites) e outras mais simples (microssatélites) (JARNE & LAGODA, 1996).

1.6 Marcadores microssatélites

Os microssatélites também conhecidos como SSR (Simple Sequence Repeats) ou STR (Short Tandem Repeats ou Repetição curtas em Tandem) consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. As diferentes repetições de microssatélites encontradas são classificadas em três famílias: (a) repetições perfeitas (por exemplo: CACACACACACACA) quando não apresentam nenhuma interrupção; (b) repetições imperfeitas (exemplo: CACACACACACATATCACACACACA), quando são interrompidas por bases não repetidas; e (c) repetições compostas (exemplo: CACACACACACACAGAGAGAGAGAGA), quando duas ou mais repetições de microssatélites estão dispostas adjacentes, as quais podem ser perfeitas ou imperfeitas (JARNE & LAGODA, 1996; CHAMBERS & MACAVOY, 2000; BORÉM, 2006).

Atualmente são os marcadores moleculares mais utilizados, devido a sua natureza multialélica, transmissão codominante, fácil detecção por PCR, relativa abundância, extensiva cobertura do genoma e necessidade mínima de DNA para análise genética (MOREIRA, 2006). Como apresentam expressão codominante e multialelismo, esta classe de marcadores apresenta o mais elevado conteúdo de informações de polimorfismo, favorecendo a mais completa cobertura do genoma. Podem ainda ser automatizáveis em sistema multiplex, que permite avaliar de forma rápida um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo (LEMES, 2000; RODRIGUES, 2007; REIS, 2009).

Os microssatélites representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais a taxas muito maiores do que as observadas nas sequências de cópia única, variando de 10^{-6} a 10^{-2} mutações por geração, sendo que a maioria é causada por alterações no número de unidades de repetições (EISEN, 1999). Acredita-se que esta instabilidade ocorre devido à alta incidência de “escorregamento” na replicação e “crossing-over” desigual.

A replicação do DNA é um processo complexo, cuja fidelidade é dependente de alguns fatores: a) da DNA polimerase; b) da ação das enzimas com atividade exonuclease, que removem bases mal pareadas inseridas erroneamente durante a replicação; c) do sistema de reparo de pareamento errôneo, que é um reparo pós replicacional (do inglês “mismatch repair system”). O processo se inicia quando, na replicação, a DNA polimerase se desliga do complexo de replicação, forçando a dissociação das duas fitas de DNA. No entanto, para reiniciar a replicação, é necessário que as duas fitas sejam re-associadas, a partir desse momento, se houver uma re-associação incorreta entre as cadeias, mutações são geradas, resultando em uma ou mais repetições não pareadas. Este erro vai gerar uma diminuição ou aumento do comprimento dos microssatélites, dependendo da fita em que ocorrer as repetições não-pareadas. Deste modo, o erro pode levar a uma diminuição do comprimento dos microssatélites (quando as repetições não pareadas estão na fita-molde) ou a um aumento

(quando as repetições não pareadas estão na fita nascente) (SCHLOTTERER. & TAUTZ, 1992). Já o “crossing-over” desigual, ocorre entre moléculas de DNA desalinhas durante a meiose, gerando a deleção de uma unidade repetida em uma molécula e sua inserção em outra. Esse processo seria mais comum nas sequências repetitivas longas e explicaria mudanças drásticas de variação de tamanho do alelo (STEPHAN & CHO, 1994).

O notável valor desses marcadores resulta na simples e econômica análise de polimorfismo e a facilidade de troca de informações entre laboratórios, visto que são plenamente transferíveis entre indivíduos dentro de uma espécie e frequentemente entre espécies taxonomicamente próximas, muitas vezes mesmo de gênero distintos (BORÉM, 2007). Dentre trabalhos realizados para a transferibilidade de locos microssatélites de plantas, destaca-se Carvalho (2007), com a transferência de *Oriza sativa* L. para *Triticum aestivum* L.; Bernardes (2008), testou com sucesso a transferência de primers desenvolvidos para *Bactris gasipaes* Kunth em *Astrocaryum aculeatum*. Marth. Gonçalves (2009), com a transferência de oligonucleotídeos desenvolvidos para *Ficus* em *F. citrifolia* Mill e *F. eximia* Schott.

Apesar de todas estas vantagens demonstradas pelos microssatélites, a utilização em larga escala tem um custo elevado e requer tecnologias para o seu desenvolvimento. Um laboratório equipado com aparelhos utilizados em rotinas de biologia molecular necessários para este fim nem sempre é disponível nas instituições de pesquisa (RODRIGUES, 2007). De acordo com a mesma autora, para obtenção dos pares de ‘oligonucleotídeos’ que amplifiquem regiões repetitivas de microssatélites, são necessários passos de caracterização de abundância de diferentes motivos repetitivos (‘motifs’), construção de bibliotecas, sequenciamento do DNA e ampla triagem dos ‘primers’ construídos, visando identificar locos mais informativos. Além disso, erros de genotipagem podem ocorrer e consistem, principalmente, na amplificação de bandas-fantasma (“stuttering patterns”), amplificação preferencial de alelos

(“large alleles dropout”) e a ocorrência de alelos nulos; além da homoplasia que pode vir a subestimar a divergência genética (ROSA, 2007).

Dessa forma, os marcadores (locos) SSR têm sido utilizados em muitos estudos de evolução, conservação e genética de populações em diferentes espécies arbóreas como *Swietenia humilis* (WHITE & POWELL, 1997), *Eucalyptus* sp. (BRONDANI *et al.*, 1998), *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI *et al.*, 1999), *Euterpe edulis* Marth (GAIOTTO, 2001), *Caesalpinia echinata* Lam (LIRA *et al.*, 2003), *Swietenia macrophylla* King (ANDRE, 2005), *Manilkara huberi* (Ducke) (AZEVEDO, 2007), *Sextonia rubra* (VERON *et al.*, 2005) *Pseudobombax munguba* (Marth. & Zcc) (MENICUCCI, 2007), *Casearia sylvestris* Sw. (CAVALLARI, 2008), *Aniba rosaeodora* (Ducke) (ANGRIZANI, 2008), *Hymenaea stigonocarpa* Marth. Ex Hayne (MORENO, 2009), *Bactris gasipaes* Kunth (RODRIGUES, 2007; REIS, 2009).

1.7 Variabilidade e Estrutura Genética em populações naturais

Os estudos da variação genética entre e dentro de populações naturais são fundamentais para o conhecimento da estrutura das populações e podem ser realizados eficientemente a partir do uso de testes de procedências e progênes ou por marcadores genéticos bioquímicos e moleculares. Entretanto, para esse objetivo, o uso de testes de procedências e progênes só podem serem realizados eficientemente quando se tem conhecimento suficiente sobre a performance silvicultural das espécies e quando realizadas em condições similares àquelas em que as espécies se encontram em condições naturais. Os parâmetros coeficiente de variação genética entre progênes e dentro de progênes, obtidos a partir desses testes, permitem avaliar a variabilidade genética e inferir sobre o sistema de cruzamento das espécies, sendo muito utilizados para estudos genéticos iniciais com espécies nativas (KAGEYAMA, 1990; RESENDE, 1999).

O sistema de reprodução possui forte influência sobre a quantidade e a distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações (HAMRICK & GODT, 1989). Dentre os vários fatores que podem afetar o sistema de reprodução pode-se citar o tamanho, a densidade populacional, o grau de estruturação populacional (FRANCESCHINELLI & BAWA, 2000) e a fragmentação de populações (YOUNG *et al.*, 1996).

A ocorrência de perturbação antrópica pode levar à alteração da distribuição da variabilidade genética gerando estruturação genética espacial nas populações arbóreas (LACERDA & KAGEYAMA, 2003; MORAES *et al.*, 2005). Para Barreira (2005), a fragmentação de contínuos florestais pode resultar em grandes prejuízos para toda a comunidade biológica. Enquanto a redução do tamanho efetivo em populações de árvores representa uma diminuição no número de indivíduos reprodutivos e na quantidade de pólen depositados, ela também pode refletir na abundância de agentes polinizadores (AIZEN & FEINSINGER, 1994).

Verifica-se que em populações de baixa densidade a ocorrência de fenômenos genéticos como a deriva genética, que provoca perda da variação genética rapidamente em pequenas populações e a endogamia (autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados) ocasionam a perda da heterozigosidade. Portanto, para a efetiva conservação genética ou exploração de uma espécie deve-se conhecer a forma em que a variação genética ocorre entre e dentro das populações, bem como o entendimento dessa variação no tempo e no espaço (BARREIRA, 2005).

A relação temporal e espacial entre indivíduos próximos aumenta a probabilidade de intercruzamento e se os mecanismos de dispersão de pólen e sementes forem restritos a uma pequena vizinhança, aumentam as chances desses indivíduos serem aparentados. O cruzamento entre parentes gera endogamia em espécies florestais, sendo determinado pela distância e taxa com que os genes migram dentro e entre populações (COLES & FOWLER,

1976 citado por BARREIRA, 2005).

Várias populações de diferentes espécies arbóreas estão sendo objeto de estudo para determinação de parâmetros de variabilidade e estrutura genética, como por exemplo *Eschweilera ovata* (Cambess) (GUSSON *et al.*, 2005), *Chorisia speciosa* A. St.-Hil (SOUZA *et al.*, 2004), *Eugenia dysenterica* (ZUCCHI *et al.*, 2003), *Copaifera langsdorffi* Desf. (PINTO *et al.*, 2004) e *Quercus lobata* (DUTECH *et al.*, 2005). Verifica-se que naquelas de polinização aberta, a maior parte da variabilidade encontra-se no nível intrapopulacional (HAMRICK, 1983), como é o caso de *Trichilia pallida* (ZIMBACK *et al.*, 2004), e *Theobroma grandiflorum* (ALVES *et al.*, 2003), *Swietenia macrophylla* (CÉSPEDES *et al.*, 2003).

A estruturação genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. Esta estrutura resulta da combinação entre mutação, migração, seleção e deriva genética, as quais definem a distribuição da variabilidade genética nas populações.

Os parâmetros mais estimados para calcular a variabilidade genética são a partir das frequências alélicas e da diversidade genética intrapopulacional, que é caracterizada pelos índices: porcentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco, heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e índice de fixação (f) (BERG & HAMRICK, 1997).

Quando as frequências alélicas em um ou mais locos é determinada, é possível prever a frequência de cada genótipo assumindo-se que cada loco está no equilíbrio de Hardy-Weinberg e que pares de locos estão no equilíbrio de ligação. Desvios desses valores previstos indicam que fatores coordenados podem estar operando para produzir associações não aleatórias de alelos dentro de ou entre locos (FUTUYMA, 2002). Em um único loco, os desvios das frequências de Hardy-Weinberg podem produzir tanto um excesso quanto uma

deficiência de heterozigotos. Botrel & Carvalho (2004), por exemplo, verificaram em populações naturais de *Machaerium villosum* excesso de heterozigotos para o conjunto das populações ($f = -0.121$). Dados semelhantes foram encontrados para *Spondias lutea* com $f = -0.0658$ (GOIS *et al.*, 2009), *Xylopia brasiliensis* Sprengel com $f = -0,221$ (PINTO & CARVALHO, 2004), *Genipa americana* L. com $f = -0,071$ (SEBBENN *et al.*, 2003). Um grande excesso é bastante incomum, mais deficiências consideráveis de heterozigotos são observadas frequentemente, estas normalmente causadas por algum tipo de efeito de endocruzamento, sendo geralmente observadas em espécies vegetais autofertilizadas. As populações de tais plantas são geneticamente variáveis, mais consistem principalmente de uma variedade de genótipos homozigotos (FUTUYMA, 2002). Em um trabalho realizado por Moraes (1992), foi observado que duas populações de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) apresentaram uma baixa taxa de fecundação cruzada, ocasionando expressiva taxa de endogamia (homozigose).

As metodologias básicas para caracterizar a estruturação genética entre populações foram propostas por Wright (1965), Nei (1978), Cockerham (1969), Vencovsky (1994) e Weir (1996), são conhecidas como:

- (i) Estatísticas F de Wright;
- (ii) Análise da variância de frequências gênicas;
- (iii) Análise da diversidade genética em populações subdivididas.

As estatísticas F permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), assim como os níveis médios de endogamia ao nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}). Os coeficientes de coancestralidade (θ) possibilitam a avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia, além de possibilitar a obtenção de estimativas de endogamia, a partir de uma base não viesada. A análise da divergência gênica em populações subdivididas permite a comparação dos níveis de heterozigosidade entre e dentro

das populações, bem como a obtenção de uma estimativa de divergência, a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas F_{ST} e θ (ZUCCHI, 2002). Assim, conforme Wright (1965):

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

Onde:

- F_{IT} = é o índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (devido ao sistema reprodutivo e subdivisão).
- F_{IS} = é o índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (devido ao sistema reprodutivo).
- F_{ST} = é o índice de fixação ou divergência genética entre populações (devido à subdivisão).

A análise das frequências gênicas foi baseada na teoria de que as populações em estudo são provenientes de uma mesma população ancestral, permitindo assim, a estimativa do coeficiente de parentesco (coancestralidade) e endogamia (COCKERHAM, 1969). Segundo Conte (2004), nessa metodologia proposta por Cockerham, todos os desvio de panmixia também são considerados devido a deriva genética e ao sistema de reprodução. Assim, conforme Cockerham (1969):

$$f = (F - \theta p)(1 - \theta p)$$

Onde:

f = mede os níveis de fixação médios dentro das populações.

F = divergência genética entre populações.

θp = coeficiente de parentesco entre dois indivíduos dentro de populações.

Nei (1978), com o objetivo de obter uma medida de estrutura de populações que acomodasse locos multialélicos, desenvolveu a análise genética em populações subdivididas. Tal parâmetro pode ser aplicado em qualquer população, independente do número de alelos

por loco, sistema de reprodução e da atuação de forças evolutivas. Com isso, a heterozigosidade total (H_T) deduz o grau de diferenciação entre subpopulações, através da seguinte forma:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Onde:

- H_T = Heterozigosidade total.
- H_S = média ponderada dos valores de H calculados para subpopulações.
- D_{ST} = componente de variabilidade atribuível à diferenciação entre subpopulações.

A razão entre D_{ST} e H_T expressa a proporção da variabilidade total explicada por diferenças genéticas entre as subdivisões da população.

$$G_{ST} = H_T - H_S$$

A endogamia em plantas pode atuar desmascarando determinados alelos deletérios recessivos, principalmente de plantas alógamas levando a diminuição do valor adaptativo da população em curto prazo, causando redução da heterozigosidade, podendo resultar em perda de diversidade alélica, levar ao declínio na variação genética, inibir a adaptação do organismo às mudanças ambientais e conseqüentemente limitar o potencial evolucionário (ZUCHI, 2002; AZEVEDO, 2007).

Outro componente da estrutura genética de plantas a ser considerado é o fluxo gênico ou a dispersão de pólen e sementes entre populações estabelecidas, que tem por finalidade diminuir a variabilidade entre populações, introduzir alelos novos em uma população e aumentar a variabilidade genética dentro de uma população (FUTUYMA, 2002). De acordo com o mesmo autor, o movimento de alelos ocorre via gametas ou sementes, porém a efetiva troca de genes entre populações, medida pela taxa de migração, geralmente é menor que o número de gametas ou sementes transportados, visto serem dependentes da taxa de sobrevivência e representatividade genética dos imigrantes. O recrutamento de novos

indivíduos em populações com intenso fluxo gênico é dependente das características das populações envolvidas, sendo que uma depende da outra. Assim, duas populações nestas condições podem ser consideradas como uma única população, evidenciando que o fluxo gênico não só influencia a estrutura genética como também define os limites da própria população (NASON *et al.*, 1996; WADT, 2001).

Diversos autores assinalaram o fato de que nem sempre as distâncias de dispersão de pólen e de sementes refletem diretamente o fluxo gênico efetivo. Daí a necessidade da utilização de marcadores genéticos para efetivamente estimarem-se intercruzamentos e movimento de genótipos através de sementes, pelo levantamento das plântulas estabelecidas após dispersão (MARTINS, 1987).

AMANCIO, A.B.; CRISTO-ARAÚJO, M; SANTOS, C.H.A.; CLEMENT, C.R; ASTOLFI-FILHO, S. and RODRIGUES, D.P. **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF 12 MICROSATELLITE MARKERS FROM THE TROPICAL TREE *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori AND CROSS-GENERA AMPLIFICATION WITHIN THE LECYTHIDACEAE**

Artigo submetido a revista Molecular Ecology Notes em 2011, como pré-requisito para a defesa de tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

2. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF 12 MICROSATELLITE MARKERS FROM THE TROPICAL TREE *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori AND CROSS-GENERA AMPLIFICATION WITHIN THE LECYTHIDACEAE

*A.B. AMANCIO, †M. CRISTO-ARAÚJO, †C.H.A. SANTOS, †C.R. CLEMENT, *S. ASTOLFI-FILHO and *D.P. RODRIGUES

* *Instituto de Ciências Biológicas (ICB) and Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Universidade Federal do Amazonas, Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Campos, 3000, Manaus, AM 69077-000, Brasil*, † *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Av. André Araújo, 2936, Manaus, AM 69060-001, Brasil*

Abstract

Twelve polymorphic microsatellite markers were developed for *Eschweilera coriacea* (D.C) S.A Mori, a tropical tree important for its wood. In one population, the number of alleles per locus ranged from 4 to 13, with an average of 7.25. The Polymorphism Information Content values ranged from 0.24 to 0.88. The observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity values ranged from 0.13 to 0.69 and 0.25 to 0.90, respectively. A cross-amplification test with three different species suggests potential transferability of all loci. These 12 loci are being used to analyze the genetic diversity of this species to subsidize conservation and management strategies.

Keywords: *Eschweilera coriacea* - Genetic diversity - Transferability - Simple Sequence Repeat loci

Eschweilera coriacea (DC.) S.A. Mori (Lecythidaceae), known in Brazil as matamatá, is a timber species of tropical humid forests found in Panama, northwestern Colombia, the Guianas and throughout the Amazon Basin. Its hard dense wood is extremely resistant and durable, and is used for civil and naval construction (Loureiro et al. 1979). Additionally, recent studies have shown that the leaves and trunk contain chemical compounds with medicinal potential as antioxidants (Yang et al. 1998; Fioratti et al. 2007). Despite its importance, there are no genetic studies of matamatá populations.

Microsatellite loci were developed from a GT enriched genomic library following the protocol described by Billotte et al. (1999). Genomic DNA was extracted from leaf tissue of a single individual of *E. coriacea* using the protocol described by Doyle and Doyle (1987) with modification. A total of 96 clones were selected and sequenced in a MEGABACE 1000 (GE Healthcare); sequences containing microsatellites were assembled and edited in Bioedit v.5.06 (Hall 1999). Of the 96 positive clones sequenced, 81 contained repetitive sequences, of which 49 (65%) were appropriate for design of primers in the flanking regions and 24 sequences were selected for primer pair design using Primer 3 (Rozen and Skalesky 2000) and Oligo Explorer 1.2 (Kuulasmaa et al. 2004). An M13 tag (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') was attached to the 5' end of all forward primers (Schuelke 2000) to facilitate fluorescent labeling of PCR products. These were tested for amplification and polymorphism in 30 individuals of *E. coriacea* of a population in the municipality of Coari, Amazonas State, Brazil and in one plant each of three species of Lecythidaceae: *Bertholletia excelsa*, *Eschweilera reticulata* and *Lecythis corrugata*.

The PCR mixture (10 μ L) contained 1x PCR buffer (10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 250 μ M dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 0.25 μ M primer forward tail M13, 0.375 μ M primer forward M13 label with FAM or HEX, 0.5 μ M primer reverse, 1.5 U Taq DNA polymerase (5 U/ μ L 500 U from Fermentas), dH₂O and 25 ng of genomic DNA. The amplifications were performed in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems) as follows: 94 °C for 2 min; 25 cycles of 94 °C for 10 s, 20 s at a primer-specific annealing temperature (Table 1) and 72 °C for

30 s; 10 cycles of 94 °C for 10 s, 50 °C for 10 s and 72 °C for 30 s and final elongation at 72 °C for 30 min. Fluorescently labeled PCR products were analyzed in a MEGABACE 1000. Alleles were sized using an ET-ROX-400 size standard (GE Healthcare). Data collection and analysis were performed using FRAGMENT PROFILE software (GE Healthcare). The allele frequencies and observed and expected heterozygosities were estimated for each locus using ARLEQUIN (Schneider et al. 2000). Population genetic structure was examined with FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001). Micro-checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) was used to identify possible null alleles.

All microsatellite loci were polymorphic. The number of alleles per locus ranged from 4 to 13, with a mean of 7.25 (Table 1). Polymorphism information content (*PIC*) (Cordeiro et al. 2003) values ranged from 0.24 to 0.88. The observed (*Ho*) and expected (*He*) heterozygosities ranged from 0.13 to 0.69 (mean 0.39) and 0.25 to 0.90 (mean 0.59), respectively. Five loci (Ec4, Ec12, Ec14, Ec15, Ec28) showed significant deviation from Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) after Bonferroni correction ($p \leq 0.05$). Values of *Fis* (*f*) ranged from 0.059 to 0.664 (mean 0.328). Possible null alleles were identified for seven loci (Ec4, Ec12, Ec14, Ec15, Ec24, Ec28, Ec29). Various factors may have contributed for the excess of homozygotes, including the mating system (Allan et al. 2007), and the dispersion of pollen and seeds. The pollination is carried out by bees of the genera *Euglossinae* that visit several flowers of the same plant before seeking other trees; fruit dispersion is barocoric, with animals discarding seed close to mother trees, causing aggregation of related individuals (MORI and PRANCE, 1990). The analysis of the mating system of *Eschweilera ovata* identified a mixed mating model with a high rate of inbreeding due to mating of related individuals (Gusson et al. 2005). There are no studies of *E. coriacea* mating system. According to Dewoody et al. (2006), demographic processes such as inbreeding and the Wahlund effect result in excess of homozygotes in all loci, while errors due to "stutter" and "dropout" of alleles and null alleles affect only some loci, which may be due to the species' mating system. Five of these seven microsatellite loci were also in H-E disequilibrium, which suggests that at least these five may influence genetic parameter estimates (Callen et al. 1993). Eleven microsatellite loci cross-amplified to *Eschweilera reticulata*, 10 cross-amplified to *Bertholletia excelsa* and 7 cross-amplified to *Lecythis corrugata* (Table 2), which suggests considerable sequence conservation within the primer regions flanking these microsatellite loci in the Lecythidaceae. These markers will be useful in the first studies of genetic diversity and population structure of *E. coriacea* now underway and will subsidize conservation and management strategies.

Table 1 – Locus names, GenBank accession numbers, repeat motifs, optimized annealing temperatures (Ta °C), primer sequences, number of alleles (A), allele sizes , (PIC) polymorphism Information Content of 12 microsatellite loci from *Eschweilera coriacea* (DC.) S. A. Mori

Locus	Accession n°.	Repeat motif	Ta (°C)	Primer sequence (5'–3')	A	Allele Size (bp)	PIC	Ho	He	P-HWE	Fis
EC4a	HQ444407	(AT) ₆ (GT) ₁₃	54	F: ATGCAGCCACTCCTCATCT R: TGCATCCCTTTCTCTCCACT	8	138-238	0.65	0.41	0.70	0.002*	0.421
EC5	HQ444408	(GT) ₁₅	60	F: TCCAATCAAAACCCACAACC R: GAAACCATTCCCTCCCCTCAC	4	165-193	0.30	0.30	0.34	0.294	0.112
EC11	HQ444409	(TC) ₁₂	54	F: TTCTTGAACCCAATCCTGT R: GGCAAACAGGCTAATAGGAC	5	142-178	0.62	0.56	0.70	0.079	0.206
EC12a	HQ444410	(AG) ₁₆	60	F: GCCAATGCTATGTGTGCATC R: TCAGATGCTAGGGCAAGACA	13	220-262	0.88	0.53	0.90	0.001*	0.415
EC14a	HQ444411	(GT) ₂₅	60	F: CTCAACCAACTCCAGTGCAA R: TCCAAACAGCGGATCCAT	4	129-181	0.46	0.30	0.56	0.001*	0.466
EC15a	HQ444412	(CA) ₁₀ (TA) ₄	60	F: CAAAAGAGATCAGCGGCACT R: CTGCTGCCTGTGTGAAAAGA	5	140-180	0.24	0.13	0.25	0.003*	0.467
EC18	HQ444413	(AC) ₁₄	58	F: ATGAGATGGTGCTATATGGC R: CGAAAATTGGGGCTATAGCT	4	211-311	0.60	0.54	0.67	0.068	0.204
EC24a	HQ444414	(CA) ₁₂	58	F: GCTAACTAAACATGTCGGGA R: GTGCCTTCTGTGATTTCTGA	7	220-334	0.43	0.30	0.45	0.006	0.341
EC28a	HQ444415	(AC) ₇	65	F: CGAGGCGTGATAGTTGAGGC R: AGTTACGGGGTGGGGTGTGA	13	204-304	0.82	0.29	0.86	0.001*	0.664
EC29a	HQ444416	(AC) ₈ (TC) ₆	60	F: GCCGATTTTGCGAAGGAGAG R: GTTAGTTTTTCGGGTTACGCC	4	238-308	0.36	0.22	0.40	0.007	0.450
EC36	HQ444417	(GA) ₅	58	F: CGTGTGACCTACATTACCA R: GGAATGTAGTTGCGAAGAGA	10	94-194	0.75	0.69	0.79	0.103	0.131
EC37	HQ444418	(TG) ₁₈	60	F: AGCTAGACATAATCCAACCC R: TCCTTTTTCTCCCCACACCA	10	168-268	0.44	0.43	0.46	0.388	0.059

Observed (*Ho*) and expected (*He*) heterozygosities, *P* value for Hardy-Weinberg Equilibrium (P-HWE) after Bonferroni correction and Fis were estimated for 30 plants from Coari, Amazonas.

* Departs significantly from Hardy-Weinberg Equilibrium after Bonferroni correction at $p < 0.05$.

Table 2 - Cross-species amplification of 12 microsatellite loci created for *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori in three species of Lecythidaceae

SSR locus	<i>Bertholletia excels</i>	<i>Eschweilera reticulata</i>	<i>Lecythis corrugata</i>
Ec4a	-	+	-
Ec5	+	+	-
Ec11	-	+	-
Ec12a	+	+	+
Ec14a	+	+	-
Ec15a	+	+	-
Ec18	+	+	+
Ec24a	+	+	+
Ec28a	+	-	+
Ec29a	+	+	+
Ec36	+	+	+
Ec37	+	+	+

+ successful amplification - unsuccessful amplification

Acknowledgments

This work was supported by PROCAD-Amazônia INPA/UNICAMP/UFRGS/CAPES (023/2006) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/CT-Amazônia (575588/08-0), coordinated by CRC. The authors thank Miriam Silva Raphael (Coordinator PROCAD-Amazônia) and Tatiana Campos (Universidade de Campinas - UNICAMP) for their contributions in the initial phase of this research; the Laboratório de Evolução Aplicada da Universidade Federal do Amazonas for laboratory facilities; Anete Pereira de Souza (CBMEG/UNICAMP) and Maria Imaculada Zucchi (ESALQ/USP) for guidance. ABA thanks CNPq for a scholarship. CRC and SAF thank CNPq for research fellowships.

References

- Allan G, Williams A, Rabinowicz PD, Chan AP, Ravel J, Keim P (2007) Worldwide genotyping of castor bean germplasm (*Ricinus communis* L.) using AFLPs and SSRs. *Genet Resour Crop Evol* doi:10.1007/s10722-007-9244-3
- Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54:277-288
- Callen DF, Thompson AD, Shen, Y et al. (1993) Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet*, 52:922-927
- Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ (2003) Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploidy species. *Plant Sci*, 155:161-168
- Dewoody J, Nason JD, Hipkins VD (2006) Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild population. *Molecular Ecology, Notes*, 6. 951-957.
- Doyle JJ, Doyle JI (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15
- Fioratti AB, Gebara KS, Lima MMS, Cardoso MLC1 (2007) Avaliação da atividade antioxidante de *Eschweilera* sp. e desenvolvimento de cosmeceúticos contendo extratos naturais. I Congresso de Farmácia de Maringá. 2006. *Arquivos do Mudi*. 1(Supl 1).[Resumos]
- Gusson, E; Sebbenn, A.M.; Kageyama, P.Y. (2005) Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n. 67, 123-135.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Kuulasmaa T, Javed AA, Muthusamy A (2004) Oligo Explorer 1.2. *Genelink*, Hawthorne, New York.

- Loureiro AA, Silva MF, Alencar JC (1979) *Essências madeireiras da Amazônia*. INPA, Manaus.
- Mori S.A.; Prance, G.T. (1990) Flora neotropica Lecythidaceae. New York. *Botanical Garden*. (monograph 21). 370p.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Lab.*, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v.18, 233-234.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *In: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds Krawetz S, Misener S), pp. 365-386, Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Yang SW, Zhou JH, Wisse R et al. (1998) Three new ellagic acid derivatives from the bark of *Eschweilera coriacea* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod* 61:901-906.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538

3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE MATAMATÁ-AMARELO (*Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori) COM MARCADORES MICROSSÁTELITES

RESUMO

A *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori é uma árvore da família Lecythidaceae, com ampla distribuição na região amazônica. É utilizada na indústria madeireira para a fabricação de poste, moirões e esteios, além de ser utilizado em construções navais. Nove locos microssatélites foram usados para avaliar a diversidade e estrutura genética de seis populações de matamatá-amarelo em diferentes regiões da Amazônia, Rondônia-RO (n=31); Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM (n=36); Reserva Adolpho Ducke, Manaus-AM (n=32); Fazenda da UFAM, Coari-AM (n=33); Fazenda Santa Helena e Ilha de Vera Cruz, Maués-AM (n =35); Vila Amazônia, Parintins-AM (n=35). Um total de 146 alelos foi detectado, com média de 16,2 alelos por locos. A diversidade total (H_T) foi 0,77, evidenciando alto conteúdo informativo. As heterozigosidades observadas (H_O) foram inferiores às esperadas (H_E) em todos os locos, sugerindo excesso de homozigotos. Os coeficientes de endogamia (f) variaram entre populações, sendo maior na Reserva Ducke (0,53) e menor na UFAM (0,29). A AMOVA detectou 87,5 % da variação dentro das populações e 12,5% entre, evidenciando estrutura genética moderada. Detectou-se baixa diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações Parintins e Maués (0,018), seguida da UFAM e Reserva Ducke (0,030), certamente devido ao alto fluxo gênico ($Nm=13,4$; 8,1, respectivamente). Valores maiores de diferenciação foram detectados entre Rondônia e UFAM ($F_{ST}=0,30$). O dendrograma de distância genética de NEI (1978) evidenciou dois grupos, um formado pelas populações de UFAM/Reserva Ducke e Parintins/Maués, e o segundo por Rondônia e Coari, indicando estrutura populacional regional, dados corroborados pelo Programa STRUCTURE. O teste de Mantel revelou relação entre distância geográfica e genética, indicando isolamento por distância. Os resultados mostram que a maior parte da variação genética é encontrada dentro das populações e que a moderada estrutura genética encontrada entre elas, pode ser explicada pelo isolamento por distância, possivelmente associada aos padrões de reprodução e demografia da população.

Palavras-chave: microssatélite, variação genética inter e intra populacional, endogamia, isolamento por distância.

DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE IN NATURAL POPULATION OF MATAMATÁ-AMARELO (*Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori) WITH MICROSSATELLITES.

ABSTRACT

Eschweilera coriacea (DC.) S.A. Mori is a tree of the family Lecythidaceae, with wide distribution in Amazônia region. It is used for lumber for fencepost, mainstay and poles, besides ship factory. Nine microsatellites loci were used to evaluate diversity and genetic structure of six populations of matamatá-amarelo in different regions of Amazonia, Rondônia-RO (n=31); Federal University of Amazonas State (UFAM), Manaus-AM (n=36); Adolpho Ducke Reserve, Manaus-AM (n=32); Federal University Farm, Coari-AM (n=33); Santa Helena Farm and Ilha de Vera Cruz, Maués-AM (n =35); Vila Amazônia, Parintins-AM (n=35). 146 alleles was detected, with mean of 16,2 alleles per loci. The total diversity (H_T) was 0,77, showing valuable information. The observed heterozygosities (H_O) were smaller than expected (H_E) in all loci, suggested excess of homozygotes. The coefficients of inbreeding (f) varied between population, being larger in Ducke Reserve (0,53) and smaller in Federal University of Amazonas State (UFAM) (0,29). The AMOVA detected 87,5 % of total variation inside populations and 12,5%. Genetic differentiation was detected (F_{ST}) between populations of Parintins and Maués (0,018), followed by UFAM and Ducke Reserve (0,030), certainly due to the high gene flow ($Nm=13,4$; 8,1, respectively). Larger values of differentiation were detected between Rondônia and UFAM ($F_{ST}=0,30$). The dendrogram of genetic distance of NEI (1978) showed two groups, one formed by UFAM/Reserva Ducke and Parintins/Maués populations and the other formed by Rondônia and Coari, showing regional population structure, data confirmed by the STRUCTURE Program. The Mantel test showed relation between geographic and genetic distance, showing distance isolation. The results indicate that most genetic variation is found inside populations and the mild genetic structure was found between populations, being explained by distance isolation, possibly associate to mating patterns and population demography.

keywords: microsatellite, inter and intrapopulation genetic variation, inbreeding, distance isolation.

3.1 INTRODUÇÃO

O matamatá-amarelo (*Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori) é uma espécie florestal pertencente à Família Lecythidaceae, com ampla distribuição na região tropical. Distribuindo-se desde o leste do Panamá e noroeste da Colômbia, englobando todos os países que fazem parte da Amazônia legal. No Brasil, ocorre na Bacia Amazônica, principalmente nas florestas de terra-firme (LOUREIRO *et al.*, 1979).

O potencial econômico da *E. coriacea* inclui o uso de sua madeira para a fabricação de portes, mourões e esteios, além de ser utilizada na construção civil. Outro importante uso é a utilização de seu extrato vegetal para fins farmacológicos (YANG *et al.*, 1998), podendo atuar como agentes antioxidantes, além de inibir o crescimento de organismos patogênicos (FREITAS *et al.*, 2005).

A madeira de *E. coriacea* faz parte dos programas de manejo florestal sustentável, por possuir características de durabilidade e resistência, que as tornam aptas à utilização na construção naval, no entanto, não pertence ao grupo das espécies nobres. Em meados de 1998, começou a ser exportada para países europeus para servir de barreiras contra o mar (Co. Pess., Josué Rogério, 2007), chegando uma Unidade de Produção Anual (UPA) explorar em torno 18.000 m³ de madeira em tora (Plano de Operação Anual, Mil Madeireira).

A Instrução Normativa N° 2 (Diário Oficial da União do Estado do Pará, N° 31706 - Seção 1, 12 de julho de 2010), regulamentou o preço de madeira em tora de *E. coriacea*, classificando-a como madeira mista e/ou branca, apresentou seu respectivo preços de mercado (18,00 reais por m³); e aparece na categoria de espécies bastante utilizadas em indústrias madeireiras, como as *Minquartia guianensis* Aubl., *Sextonia rubra*, *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn, *Goupia glabra* Aubl, *Virola* sp. entre outras, tornando-se portanto, uma espécie com potencial de mercado.

Apesar das várias características favoráveis ao aproveitamento do lenho de *E. coriacea*, o tradicionalismo existente no setor madeireiro, seja através do investidor como do consumidor, limita a introdução de novas espécies no mercado. Paralelo a isso, o desconhecimento de tecnologias para o corte de madeiras duras, influencia a exaustiva repetição da escolha das mesmas espécies para serem comercializadas (MADY, 1998). Como é o caso da acariquara (*Minquartia guianensis*) espécie utilizada na forma de postes e esteios que sofre super exploração devido a alta qualidade de sua madeira (FRANKHAN *et al.*, 1999). Uma alternativa para minimizar os impactos decorrentes da exploração nessa espécie seria utilizar a madeira de matamatá-amarelo em substituição à das acariquaras, já que possui elevada representatividade em estudos fitossociológicos e uma excelente distribuição nos diferentes ecossistemas amazônicos (MADY, 1998).

Atualmente, há um risco real de erosão genética nas populações naturais, em função de perturbações antrópicas, que geram entre outros aspectos, a destruição de habitats e a fragmentação de populações naturais, acarretando assim, uma limitação evolutiva para as espécies que compõem esses biomas (BARRET & KHON, 1991). Desta forma, o conhecimento da composição e estruturação genética de populações *E. coriacea* é de fundamental importância para futuras ações de manejo e conservação da espécie. Entre outros aspectos também é importante entender se a estruturação genética encontrada é uma característica natural da espécie ou é resultado de barreiras físicas causadas pelo homem.

A utilização de ferramentas biotecnológicas que permitem acessar a variabilidade genética das espécies e quantificar seus níveis é indicada para este fim. Dentre essas, destaca-se os marcadores moleculares microssatélites (SSR) que são de natureza codominantes, multi alélicos e propiciam um alto conteúdo de informação genética (COLLEVATTI *et al.*, 1999). Tais atributos permitem caracterizar corretamente um indivíduo em uma população, bem como monitorar a transmissão de genes através de

gerações, acelerando a obtenção das estimativas de parâmetros genéticos imprescindíveis nos estudos de populações e conservação genética (CHASE *et al.*, 1995). Estudos recentes usando microssatélites em espécies arbóreas amazônicas como a exemplo, *Carapa guianensis* (DAYANANDAN *et al.*, 1999; VINSON *et al.*, 2005, VERAS, 2011), *Dinizia excelsa* Ducke (DICK & HAMILTON, 1999), *Sextonia rubra* (VERON *et al.*, 2005), demonstram que locos microssatélites são altamente multi-alélicos e informativos para estudo de estrutura genética de populações.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade e a estrutura genética de populações naturais de *Eschweilera coriacea* por meio de marcadores moleculares microssatélites, para direcionar estratégias de manejo que visem à conservação e a utilização destes recursos genéticos de forma adequada.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Locais de coleta

Foram amostrados 202 indivíduos de *Eschweilera coriacea* pertencentes a seis populações distribuídas em dois Estados da Região Amazônica (Figura 1). As populações amostradas estão separadas por distâncias que variam entre 30 a 1200 Km ou por grandes rios. Foram amostrados uma média de 33,2 indivíduos, nas seguintes localidades: 1) ao longo da Rodovia BR-429, na fronteira Brasil/Bolívia, Rondônia-RO (n=31), 2) Fragmento Florestal da Universidade Federal do Amazonas – UFAM - Manaus-AM (n=36), 3) Reserva Adolpho Ducke, Manaus-AM (n=32), 4) Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, Coari-AM (n=33), 5) Fazenda Santa Helena e Ilha de Vera Cruz, Maués-AM (n=35) e 6) Vila Amazônia, Parintins-AM (n=35) (Apêndice 1).

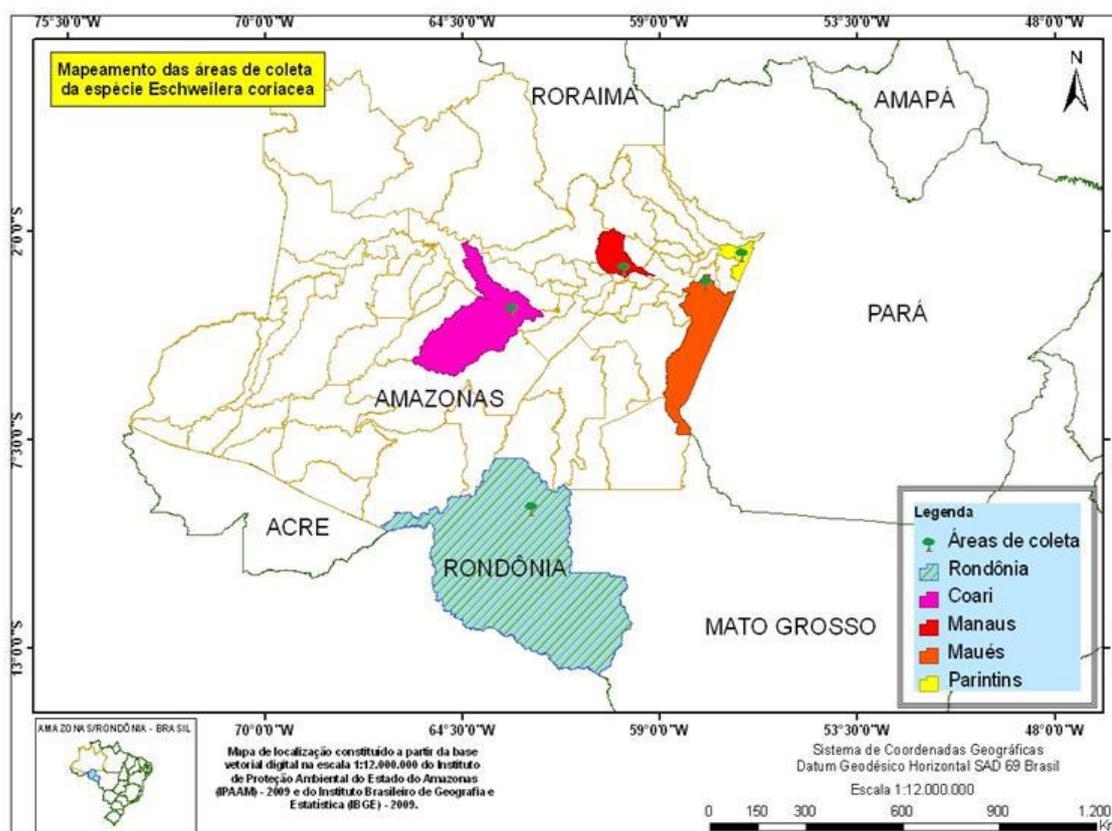


Figura 1. Localização das áreas de coleta de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori nos Estados do Amazonas e Rondônia.

As coordenadas geográficas dos locais de coleta de cada indivíduo foram estabelecidas utilizando-se o Sistema de Posicionamento Global (GPS) e georeferenciadas em mapa (Apêndice 2).

3.2.2 Caracterização dos indivíduos coletados

As populações coletadas foram inventariadas quanto a sua altura total (HT), altura comercial (HC), circunferência a altura do peito (CAP), feno-fase (FF) e posição sociológica (PS) (Apêndice 1). Posteriormente, os dados de CAP foram transformados em diâmetro à altura do peito (DAP), por meio da fórmula $DAP = CAP / \pi$ (Apêndice 2). Foi feita a exsicata de um indivíduo com flores da população do Fragmento Florestal da Universidade Federal do Amazonas - UFAM e depositada no herbário da mesma Instituição sob o nº 06325 e registro de nº 8007. A autorização para a coleta de material botânico, fúngico e microbiológico no IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis), o SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) está sob o nº 2514104.

3.2.3 Material vegetal e extração de DNA

As amostras de folhas e câmbios das seis populações de *E. coriacea* foram coletadas com o auxílio de um podão de 12 metros e uma ferramenta chamada vazador, as quais após a coleta, foram acondicionadas em sacos de papel com sílica armazenados a -20 °C no Laboratório de Evolução Aplicada (LEA) da UFAM.

A extração do DNA genômico foi realizada com método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987), utilizando o protocolo otimizado por Ferreira & Gratapaglia (1998) com algumas modificações, utilizando o homogeneizador Precellys 24 (Bertin Technologies,

USA) para a maceração das folhas e câmbios.

A quantificação do DNA extraído foi realizada por comparação com padrões de massa molecular conhecida (DNA fago lambda, Fermentas) em gel de agarose 0,8 % corado com GELRED (UNISCIENCE, Brasil), analisados em transluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados em equipamento EasyDoc 100 (Bioagency, Brasil). Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultra pura e padronizadas a uma concentração de 10 ng/ μ L.

3.2.4 Amplificação dos locos microssatélites

Utilizaram-se nove pares de oligonucleotídeos microssatélites desenvolvidos para *E. coriacea* (AMANCIO *et al.* 2011, Capítulo 2). Adicionou-se à extremidade 5' do 'primer forward' de cada locos a sequência M13 (5' TGTAACGACGGCCAGT 3'), e uma outra sequência M13 foi marcada com fluorocromo específico (6-FAM), segundo o protocolo de Schuelke (2000) com algumas modificações. As reações de PCR foram conduzidas utilizando-se volume final de 10 μ L, contendo 1 μ L de tampão 10X (Tris HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 1 μ L dNTP (2,5 μ M/ μ L), 1 μ L de MgCl₂ (25 mM/ μ L), 0,8 μ L de BSA (2,5 μ M), 1 μ L do primer Reverse (2,5 μ M/ μ L), 0,5 μ L do primer Forward (2,5 μ M/ μ L), 0,5 μ L do primer M13 (2,5 μ M/ μ L) marcado com fluorescência FAM, 4 μ L de DNA genômico (10 ng/ μ L) e 0,2 μ L de Enzima Taq DNA polimerase (5 U/ μ L) (Fermentas, Canadá). As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti (Life Technologies, Brasil) seguindo o programa: 94 °C por 2 minutos; 25 ciclos de 94 °C por 10 segundos, a temperatura de anelamento (T_A), por 20 segundos, 72 °C por 30 segundos; um ciclo de 72 °C por 10 minutos, 20 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 50 °C por 20 segundos, 72 °C por 30 segundos, e uma extensão a 72 °C por 30 minutos.

Os produtos dos PCRs foram diluídos em água ultra pura (diluições de 1/10, 1/30 e

1/60) de acordo com o padrão de intensidade das bandas visualizadas em gel de agarose 2%. Para cada 1 μL de produto diluído foram adicionados 8,0 μL de formamida Hi - Di (Life Technologies, Brasil), 1,0 μL de ROX (6-carboxi-X-rodamina (ROX) *size standard*, que consiste em uma série de fragmentos de tamanho diferente e conhecido, amplificados com *primers* específicos a partir de um molde de DNA conhecido pUC19), modificado de De Woody *et al.* (2004), que depois de preparado foi diluído 1:5. As amostras foram genotipadas em sequenciador automático ABI 3130 xl (Life Technologies, Brasil), e o relatório de genótipos de cada indivíduo foi gerado com auxílio do Programa Gene Mapper (Life Technologies, Brasil).

3.2.5 Análise dos dados Genéticos

As frequências alélicas e os alelos privados de cada loco foram calculados por meio dos programas CONVERT (GLAUBITZ, 2004). As estimativas de diversidade genética, o número de alelos (A), a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), coeficiente de endogamia (f) foram calculadas para cada loco e população por meio do programa FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2000). Os alelos foram classificados como comum (frequência $> 0,2$), intermediário ($> 0,05$) ou raro ($< 0,05$), bem como privado (presente em apenas uma população), esporádico (presente em três populações) ou difundido (acima de três populações), similar ao esquema de Marshall & Brown (1975). O programa MICRO-CHECKER 2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004) foi utilizado para identificar possíveis problemas com *stuttering*, *largeallele dropout* (alelos com baixa eficiência de amplificação) e com presença de alelos nulos, que são erros que podem ocorrer durante a amplificação com os novos *primers*.

O programa Genepop v.3.1 (RAYMOND & ROUSSET, 1995) foi utilizado para testar o desequilíbrio de ligação entre pares de locos (Opção 2, sub-opção 1 com 1000

desmemorizações, 10 lotes de dados e 1000 interações por lote) e o teste exato para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (Opção1, sub-opção 3 com 5000 desmemorizações, 500 lotes de dados e 5000 interações por lote) para as amostras populacionais. Os níveis de significância foram ajustados usando o método de Bonferroni, para examinar os testes múltiplos na série de dados (RICE, 1989).

O programa STRUCTURE 2.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000; PRITCHARD & WEN, 2003) foi utilizado para inferir o melhor K (número de agrupamentos – clusters), verificando o comportamento e a consistência dos agrupamentos formados e quantificando os indivíduos semelhantes dentro das “populações” estudadas. Os parâmetros utilizados foram: burn-in de 10.000 permutações, Markov Chain Monte Carlo (MCMC) com 100.000 permutações, o modelo de ancestralidade “admixture”, onde cada indivíduo pode ter ancestrais de mais de uma população, e a frequência alélica independente ($\lambda=1$). A escolha do melhor K foi realizada por meio dos valores de LNP (D) e de ΔK de acordo com EVANNO *et al.* (2005) a partir de 15 simulações para cada K.

As estimativas dos parâmetros genéticos H_T e G_{ST} , e os análogos das estatísticas F (WRIGHT, 1951), θ (similar a F_{ST}) estimativa de divergência entre populações, f (similar a F_{IS}) e F (similar a F_{IT}) estimativa de excesso de heterozigotos (< 0) e deficiência (> 0) dentro de cada população e no conjunto de populações, respectivamente (WEIR & COCKERMAN, 1984), foram calculados com os programas FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e GENETIX v.4.05.2 (BELKHIR *et al.*, 2004). A significância estatística de f e θ foi testada por ‘bootstrap’ para todos os locos, com intervalo de confiança de 95%.

Para determinar a distribuição da variabilidade genética detectada dentro e entre as populações, uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) (MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996) foi efetuada usando o programa Arlequin v.3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2006). O grau de diferenciação das populações foi quantificado pela estimativa de F_{ST} entre

os pares com auxílio do Programa Arlequin v.3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2006). O fluxo gênico médio foi estimado assumindo que $Nm = (1/F_{ST} - 1)/4$ (WHITLOCK & MCCAULEY, 1999) e o número absoluto de migrantes ($M = 2Nm$) entre populações também foi estimado com base em F_{ST} , usando o programa Arlequin v.3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2006).

Para determinar a relação genética entre as populações foi estimada a distância genética de Nei (1978), calculada com o programa TFGA (Tools For Population Genetic Analyses) (MILLER, 1997). As populações foram agrupadas pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) média aritmética não ponderada, com simulações de 10000 bootstrap. Para o teste da hipótese de isolamento por distância, foram correlacionadas as medidas de distância genética Nei (1978) e distância geográfica (Km) entre as populações de *E. coriacea*, par a par, utilizando-se o teste de Mantel (MANTEL, 1967) implementado no programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2006). A matriz de distância geográfica entre os pontos de coleta foi estimada seguindo o curso do rio com o auxílio do programa *GOOGLE EARTH* 4.3.7.3 beta 2008.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Diversidade alélica dos locos microssatélites

Os nove locos microssatélites detectaram 146 alelos nas seis populações de *Eschweilera coriacea*, com uma média de 16,2 alelos por locos. O número de alelos (*A*) por locos variou de 5 (Ec14) a 28 (Ec24), confirmando o alto conteúdo de informação genética desse tipo de marcador para estudos genéticos em espécies arbóreas tropicais (Figura 2). Valores similares foram encontrados em outras espécies florestais, incluindo *Sextonia rubra* (VERON *et al.*, 2005), *Aniba roseodora* Ducke (ANGRIZANNI, 2008), *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) (BISCAIA *et al.*, 2008), *Manilkara huberi* (AZEVEDO *et al.*, 2007), *Hevea brasiliensis* Aubl. (GOUVÊA *et al.*, 2010), *Bertholletia excelsa* (SUJII *et al.*, 2011), *Copaifera* sp. (SILVA, 2011) e *Carapa guianensis* (VERAS, 2011).

O número efetivo médio de alelos por locos variou de 2,2 (Ec15) a 7,2 (Ec24) sendo menor que o número de alelos por locos, sugerindo que embora os locos tenham sido altamente polimórficos, a maioria dos alelos apresentou baixa frequência, provavelmente devido a distribuição desigual de frequências alélicas, como relatado por Raposo *et al.* (2007) estudando duas populações de andiroba (*Carapa guianensis*) no Acre com sete locos microssatélites. As populações de Rondônia, Coari, UFAM e Reserva Ducke apresentaram alelos com frequência entre 0,6 e 0,8 para seis locos microssatélites, já nas populações de Parintins e Maués, observaram-se frequências menores que 0,6 para os nove locos.

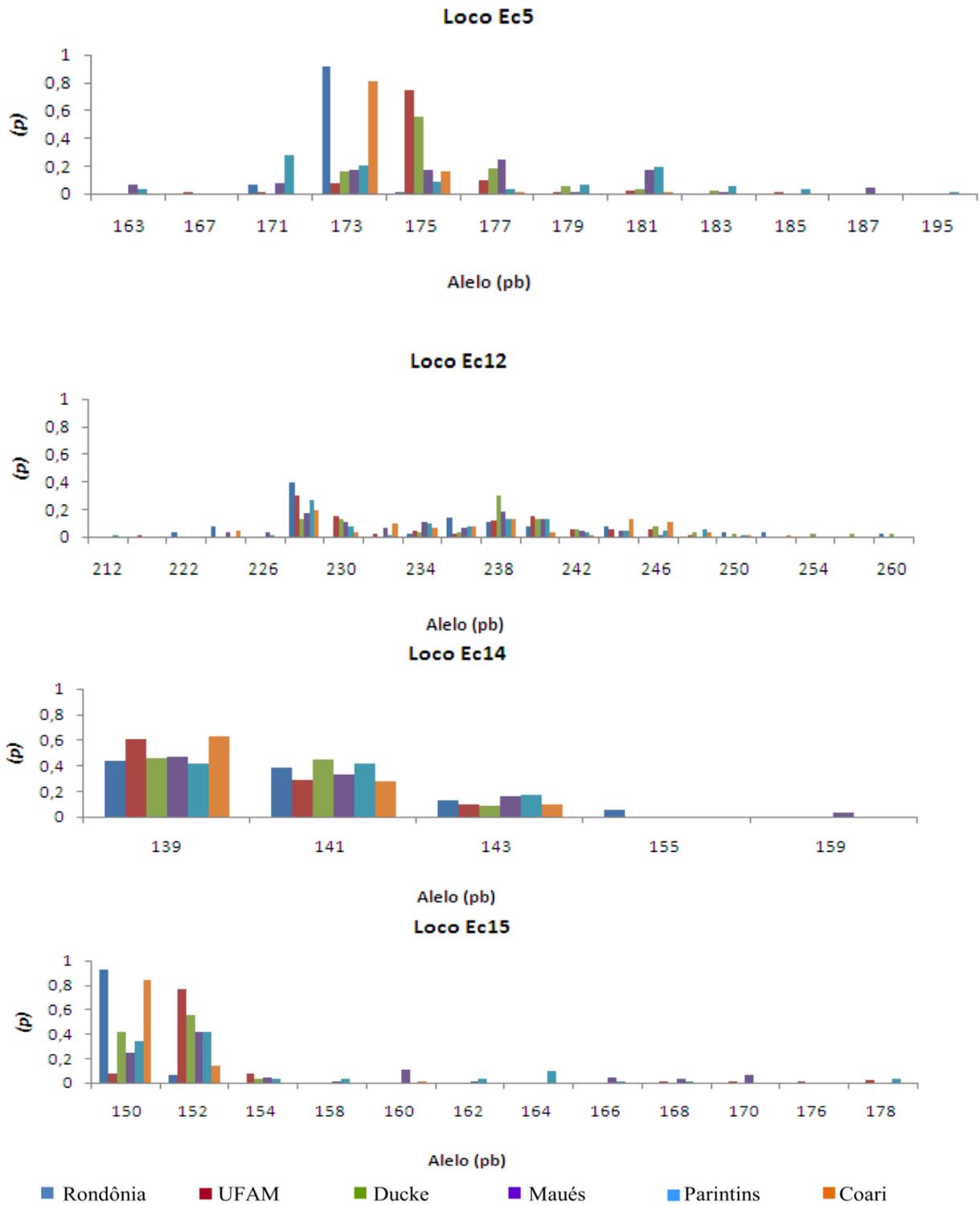


Figura 2 – Histograma de distribuição das frequências alélicas de nove locos microssatélites em amostras de seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori.

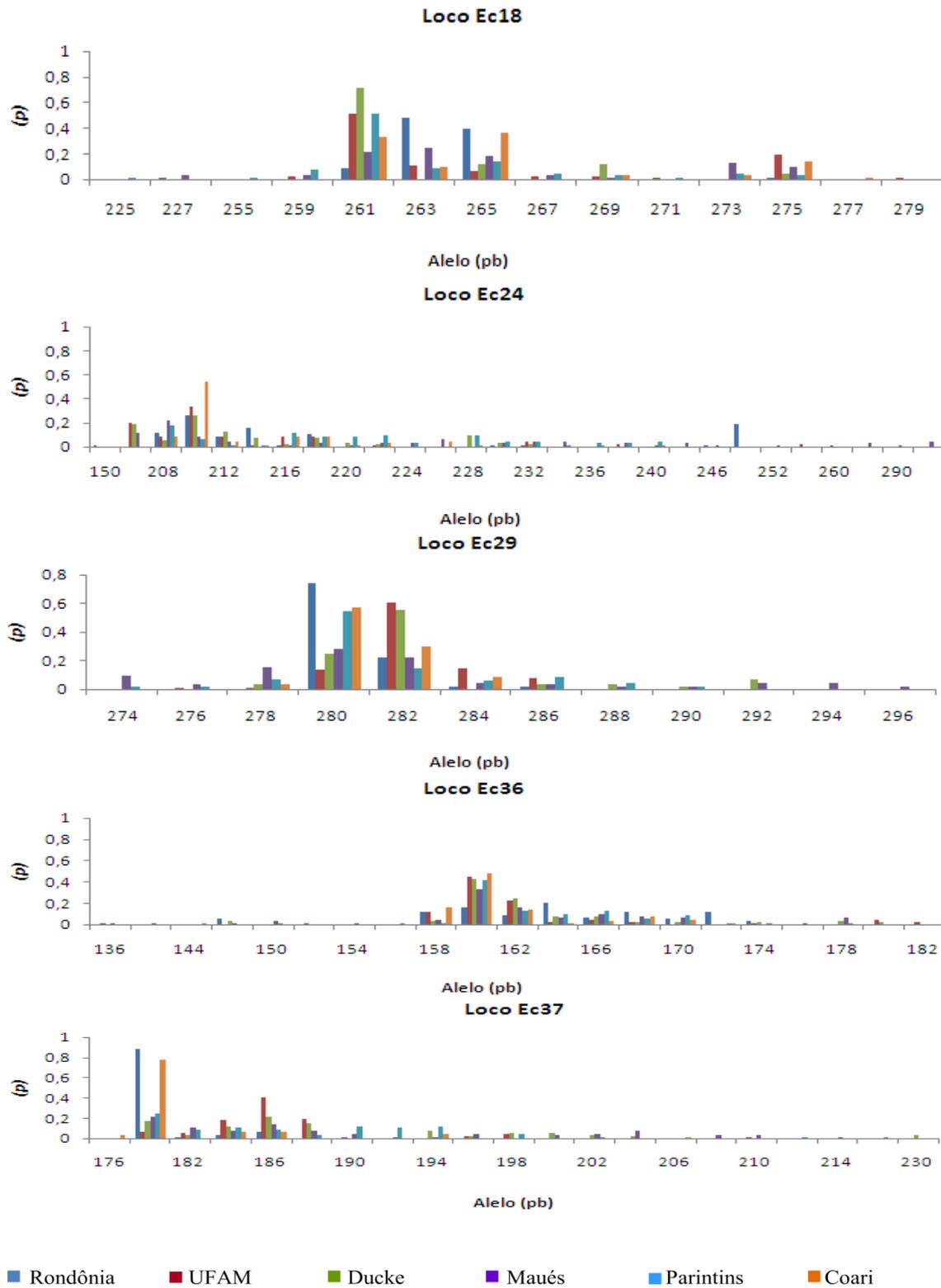


Figura 2 – Continuação

Os alelos foram classificados de acordo com suas frequências e distribuição entre as populações (Tabela 1). Os alelos comuns e intermediários (44) se apresentaram em menor quantidade em relação aos alelos raros (102) provavelmente devido às altas taxas de mutação dos microssatélites (SLATKIN, 1995). Valores altos como o apresentado nessa pesquisa foram encontrados em duas populações de andiroba (*Carapa guienensis*) no Acre (RAPOSO *et al.*, 2007). Foram observados 41 alelos privados, destes, 100% foram classificados como raros. Bajay (2009) usando vinte e seis locos microssatélites, encontrou resultados similares para três populações de *Ricinus communis*, o que sugere que alelos privados são frequentes e podem indicar fluxo gênico restrito (SEOANE *et al.*, 2000).

Tabela 1 – Classificação do número de alelos de acordo com sua frequência e distribuição entre amostras de seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori, considerando nove locos microssatélites

	Comum (> 0,2)	Intermediário (> 0,05 e < 0,2)	Raro (< 0,05)	Total
Privados	0	0	41	41
Esporádicos	0	3	47	50
Difundidos	14	27	14	55
Total	14	30	102	146

Tanto a riqueza alélica quanto a presença de alelos raros ou privados são importantes na tomada de decisões conservacionistas. Neste trabalho, a alta porcentagem de alelos raros encontrados nas populações indica o comprometimento das mesmas com a perda de diversidade genética pela atuação de deriva genética. A porcentagem de alelos perdidos (geralmente alelos raros) é o melhor indicativo para demonstrar a perda de variabilidade genética em populações advindas de fragmentação (KALINOWSKI, 2004). A presença de alelos raros nas populações de *E. coriacea* estudadas comprova a importância de se conservar a maioria dos indivíduos amostrados, uma vez que esses alelos podem ser importantes na contribuição da variabilidade genética da espécie e sua sobrevivência em condições adversas. Assim, embora tenha sido detectada alta diversidade genética nestas populações, há possibilidade de que a deriva genética esteja atuando, o que

significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos (VIEGAS, 2009). Segundo o mesmo autor, a fragmentação e o isolamento das populações em decorrência das atividades antrópicas podem ser os agentes causais deste desequilíbrio na estrutura genética nas populações de espécies florestais.

As estimativas de diversidade total (H_7) foram altas para todos os locos analisados (Tabela 2), com valores entre 0,61 (Ec14) a 0,90 (Ec24), sendo similares às encontradas por *Gusson et al.* (2005) em estudo sobre a diversidade genética em populações naturais de *Eschweilera ovata* utilizando isoenzimas e *Sujii et al.* (2011) com 11 locos microssatélites para a espécie *Bertholletia excelsa*.

As estimativas de heterozigosidade observadas (H_O) foram menores que 0,5 para a maioria dos locos, variando de 0,07 (Ec15) a 0,75 (Ec36). As heterozigosidades esperadas (H_E) variaram de 0,13 (Ec15) a 0,92 (Ec24). Os valores de H_O foram inferiores aos valores de H_E na maioria dos locos, com exceção dos locos Ec37 na população de Rondônia (Tabela 2). Diferenças claras entre H_O e H_E para a maioria dos locos indicam deficiências de heterozigotos, também observado em estudos com *Eschweilera ovata* (GUSSON *et al.*, 2005) e em progênies e matrizes de *Tabebuia roseo-alba* e *Tectona grandis* (MARTINEZ, 2008; ALCÂNTARA, 2009). Considerando que poucos indivíduos falharam na amplificação individual dos locos, alelos nulos são improváveis para explicar a deficiência de heterozigotos (SELKOE & TOONEN, 2006).

Tabela 2 - Índices de diversidade genética, coeficiente de endogamia e diferenciação genética para seis populações de *Eschweilera coriacea* (A.P. de Candolle) Mori com base na variação de nove locos microssatélites. *A* - Número de alelos; *P* - Número de alelos privados; *H_O* - Heterozigosidade observada; *H_E* - Heterozigosidade esperada; *f* - Coeficiente de endogamia de Weir e Cockerham (1984); *H_T* - Diversidade genética total; *G_{ST}* - Estimador da diferenciação genética de Nei; *R_{ST}* - Estimador de diferenciação genética (stepwise mutation model – SMM); **H_O* - significativamente diferente de *H_E* a $p < 0,05$. **F_{IS}* - não diferente de zero a $p > 0,05$

População		Ec5	Ec12	Ec14	Ec15	Ec18	Ec24	Ec29	Ec36	Ec37	Todos os locos
Rondônia (30)	<i>P</i>	-	1	1	-	-	2	-	-	-	4
	<i>A</i>	3	11	4	2	5	11	4	10	4	54
	<i>H_O</i>	0,10	0,54	0,50	0,07	0,17	0,72	0,28	0,50	0,23	0,35
	<i>H_E</i>	0,16	0,81*	0,66	0,13	0,61*	0,85*	0,41	0,89*	0,22	0,43
	<i>f</i>	0,37	0,34*	0,24*	0,48	0,72*	0,15	0,32	0,44*	-0,07	0,33
UFAM (37)	<i>P</i>	1	1	-	1	1	2	-	2	-	8
	<i>A</i>	8	12	3	7	9	12	6	11	9	77
	<i>H_O</i>	0,32	0,65	0,29	0,30	0,31	0,65	0,51	0,57	0,56	0,46
	<i>H_E</i>	0,44*	0,85*	0,54*	0,40*	0,69*	0,83*	0,59*	0,74*	0,77*	0,65
	<i>f</i>	0,26	0,24*	0,47*	0,26	0,56*	0,22*	0,13	0,23*	0,28*	0,29
Ducke (29)	<i>P</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	1	3
	<i>A</i>	6	13	3	3	4	12	7	11	12	71
	<i>H_O</i>	0,39	0,59	0,36	0,07	0,08	0,26	0,39	0,43	0,54	0,35
	<i>H_E</i>	0,64*	0,86*	0,59*	0,53*	0,46*	0,87*	0,63*	0,75*	0,89*	0,69
	<i>f</i>	0,39*	0,32*	0,40*	0,87*	0,83*	0,71*	0,38*	0,43*	0,40*	0,53
Maués (32)	<i>P</i>	1	-	1	-	-	5	2	3	2	14
	<i>A</i>	9	12	4	9	9	21	12	14	15	105
	<i>H_O</i>	0,32	0,50	0,40	0,31	0,40	0,45	0,47	0,75	0,45	0,45
	<i>H_E</i>	0,85*	0,89*	0,65*	0,75*	0,84*	0,92*	0,84*	0,85	0,91*	0,83
	<i>f</i>	0,62*	0,45*	0,39*	0,59*	0,53*	0,51*	0,45*	0,12	0,51*	0,46
Parintins (35)	<i>P</i>	1	1	-	1	2	-	-	1	2	8
	<i>A</i>	10	14	3	9	11	16	9	12	12	96
	<i>H_O</i>	0,52	0,60	0,40	0,23	0,57	0,52	0,32	0,43	0,55	0,46
	<i>H_E</i>	0,84*	0,88*	0,64*	0,71*	0,71*	0,92*	0,67*	0,78*	0,88*	0,78
	<i>f</i>	0,39*	0,32*	0,37*	0,68*	0,19	0,44*	0,52*	0,46*	0,39*	0,42
Coari (32)	<i>P</i>	-	-	-	-	1	-	-	1	2	4
	<i>A</i>	4	14	3	3	7	12	4	9	6	62
	<i>H_O</i>	0,28	0,61	0,39	0,23	0,41	0,32	0,25	0,36	0,31	0,35
	<i>H_E</i>	0,32*	0,90*	0,53	0,28	0,74*	0,68*	0,58*	0,72*	0,38	0,57
	<i>f</i>	0,12	0,33*	0,27	0,19	0,46*	0,53*	0,57*	0,51*	0,19	0,35
<i>E. coriacea</i> (195)	<i>A</i>	12	21	5	12	14	28	12	21	21	146
	<i>H_T</i>	0,78	0,88	0,61	0,65	0,78	0,90	0,71	0,81	0,82	0,77
	<i>G_{ST}</i>	0,30	0,01	0,01	0,27	0,12	0,05	0,12	0,02	0,17	0,12
	<i>R_{ST}</i>	0,13	0,02	0,02	0,16	0,03	0,09	0,03	0,00	0,23	0,08

O teste exato de Fisher revelou que 85,2% dos locos não aderem o EHW no conjunto de populações. Bajay (2009) demonstrou, usando 26 locos microssatélites, deficiência significativa de heterozigotos em todos os locos de mamona (*Ricinus communis*) e sugeriu que o fato possa estar relacionado com o sistema reprodutivo misto, com predominância de autogamia.

Os desvios de EHW são causados pelo sistema de reprodução ou por fatores evolutivos como seleção, migração, mutação ou deriva genética (HARTL, 2010; GRIFFITHS *et al.*, 2002). Embora não se tenha informação a respeito do modo de reprodução de *E. coriacea*, sabe-se que a mesma tem flores hermafroditas polinizadas por abelhas do gênero *Euglossinea*, com autonomia de vôo reduzida e que visitam várias flores da mesma planta antes de procurar outras e suas sementes são dispersas por animais que as depositam próximo à árvores mães (MORI, 1990), favorecendo a agregação de indivíduos aparentados, que é uma característica da espécie, permitindo assim, o cruzamentos entre parentes.

Os testes de desequilíbrio de ligação não foram significativos para os pares de locos em cada população, revelando 77,8% de independência dos locos nas seis populações avaliadas. As populações de Rondônia, Maués e Coari apresentaram 88,9% de independência dos locos microssatélites, seguindo de 83,3% nas populações da UFAM e Parintins e 86,1% na população de Maués ($p > 0,05\%$, após correção de Bonferroni). Isto sugere que a maioria dos locos está amostrado em regiões independentes no genoma, como observado por Castellen (2005) utilizando nove locos para *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne).

A análise pelo programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004) indicou evidência da presença de alelos nulos devido o excesso de homozigotos para todos os locos, e não evidenciou a presença de “stutter” e “drouput” de alelos. De acordo com De

Woody *et al.* (2004), processos demográficos como endocruzamentos e efeito Wahlund resultam em excessos de homozigotos em todos os locos, enquanto erros devido a “stutter” e “droupout” de alelos e alelos nulos afetam apenas alguns locos.

Medeiros (2006), observou superestimação de alelos nulos para cinco locos avaliados pelo programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004) com excesso significativo de homozigotos em relação às frequências estimadas através da análise de progênie de *T. aurea*. Dados similares foram obtidos por Bajay (2009) em vinte e seis locos SSRs desenvolvidos para mamona (*Ricinus communis*). Uma vez que a análise do Programa Micro-checker é feita para a população através de um modelo que assume Equilíbrio de Hardy-Weinberg (BROOKFIELD, 1996), e muitos locos desviaram das frequências esperadas, a frequência de alelo nulo pode ter sido superestimada porque esse modelo não desconta o excesso de homozigotos devido o endocruzamento.

Em nosso estudo é possível que a presença de alelos nulos em todos os locos seja devido a fatores comportamentais da planta que podem ter contribuído para o excesso de homozigotos, como o sistema reprodutivo e dispersão de pólen e sementes. A polinização é realizada por abelhas do gênero *Euglossinae* que visitam várias flores da mesma planta antes de procurar outra (MORI, 1988). O modo de dispersão dos frutos é a barocoria, seguida por animais que os descartam nas proximidades das árvores maternas, ocasionando agregação de indivíduos aparentados (MORI, 1990). Porém, sabe-se que outra espécie do mesmo gênero, *Eschweilera ovata* possui um sistema misto de cruzamento, com alta taxa de endogamia decorrente de cruzamentos entre parentes (GUSSON *et al.*, 2006).

Os níveis de endogamia estimados pelos índices de Weir & Cockerman (1984) foram altamente significativos ($p < 0,05$) para maioria dos locos (Tabela 2). Os valores de endogamia observados variaram de -0,07 (Ec37) a 0,87 (Ec15) para cada loco e populações. O loco Ec12 apresentou índices de fixação significativos para as seis

populações, o que concorda com a deficiência de heterozigotos observada. Dados similares foram encontrados para o pau-rosa (*Aniba roseodora*) (ANGRIZANI, 2007). Azevedo (2007) também encontrou valores de f consistentes indicando excesso de indivíduos homozigotos em todas as gerações avaliadas de *M. huberi* (Ducke).

A endogamia aumenta a probabilidade de gerar genótipos homozigotos de alelos letais, semi-letais ou deletérios idênticos por descendência (SHIMIZU, 2007). De acordo com o mesmo autor, nas espécies florestais, existe uma frequência considerável de alelos recessivos de efeitos deletérios e letais que, quando combinados em homozigose, resultam em indivíduos de baixa viabilidade para sobreviver e se reproduzir. Na prática, isso pode significar baixa ou nenhuma produção de sementes viáveis, produção de mudas de baixo vigor, defeituosas e de pigmentação anormal, plantas incapazes de se reproduzir e outras anomalias (DUDASH & FENSTER, 2000). Em muitos casos, os cruzamentos endogâmicos nem chegam a formar sementes, é o caso de árvores isoladas ou mesmo que estejam em meios às outras da mesma espécie, que florescem, individualmente, em época diferente das demais. Nesses casos, a reprodução só poderia ocorrer mediante a autofecundação ou por apomixia (SHIMIZU, 2007).

3.3.2 Diversidade genética populacional

O número de alelos para todos os locos foi maior nas populações de Maués (105) e menor em Rondônia (54) (Tabela 2). O número de alelos privados variou de 3 (Reserva Ducke) a 14 (Maués). Os índices de diversidade estimados pelas heterozigosidades esperadas e observadas foram semelhantes para a maioria das populações, variando entre 0,35/0,43 (H_O/H_E) a 0,46/0,83 (H_O/H_E), sendo a H_O menores nas populações de Rondônia, Coari e Reserva Ducke e maiores nas populações da UFAM, Maués e Parintins.

Os coeficientes de endogamia (f) médio das populações foram significativamente

diferentes de zero ($p < 0,05$), sendo maior na Reserva Ducke (0,53) e menor na UFAM (0,29) (Tabela 2), evidenciando a ocorrência de endogamia nas populações analisadas de *E. coriacea*. Resultados similares foram detectados por Gusson *et al.*, (2005), Castellen (2005), Angrizani (2008), Bajay (2009) e Farias (2010). Observou-se que o baixo valor do coeficiente de endogamia na UFAM pode ser reflexo da heterogeneidade da população, compostas por árvores remanescentes da fragmentação florestal, com sementes podendo ser derivadas de diferentes locais. Já na Reserva Ducke, em se tratando de uma população natural, pode haver estruturação populacional, favorecendo o cruzamento de parentes.

3.3.3 Estrutura genética populacional

A análise da variância molecular (AMOVA) estimou a partição da diversidade genética total de forma hierárquica entre e dentro das populações de *E. coriacea*, detectando que 87,5 % do total da variação genética foi encontrada dentro e 12,5% entre as populações, com valores significativos ($p < 0,001$). A proporção entre as populações é similar para as estimativas de G_{ST} (0,13), R_{ST} (0,08) e Θ (0,11) confirmando estrutura genética entre as populações, assim como observado para *Swietenia macrophylla* King (LEMES *et al.*, 2003), *Minquartia guianensis* Aubl. (FARIAS, 2010), *Carapa guianensis* (VERAS, 2011) com marcadores microsatélites. Esta estruturação poderia ser explicada pela dispersão de sementes através de animais de pequeno porte, que regurgitam as sementes próximas à planta mãe, restringindo o fluxo gênico entre árvores distantes (MORI, 1990). Além disso, há frutos que não são consumidos pela fauna e caem ao solo, ficando sob a copa da planta materna (SOUZA, 2011).

A análise Bayesiana implementada pelo Programa STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD & WEN, 2003) evidenciou dois grupos distintos, baseado no cálculo de ΔK proposto por Evanno *et al.* (2005) (Figura 3). É possível verificar que as populações Rondônia e Coari

fazem parte do mesmo grupo (cor verde), a população da UFAM apresenta a maioria dos seus indivíduos no grupo vermelho e as populações Reserva Ducke, Maués e Parintins apresentam-se parte no grupo verde e parte no vermelho, isto porque apresentaram indivíduos com 50% de probabilidade de seu genoma associado a um dos grupos (Figura 4).

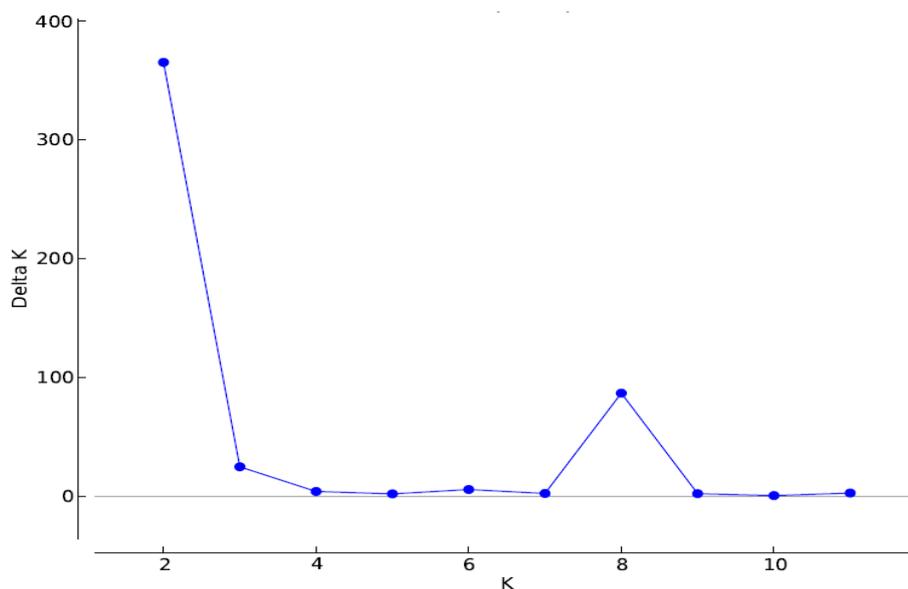


Figura 3 – Agrupamentos populacionais identificados pelo programa STRUCTURE com base em nove locos microssatélites de *Eschweilera coriacea* (DC.) S. A. Mori (ΔK com K 2 a 12 com 10 simulações).

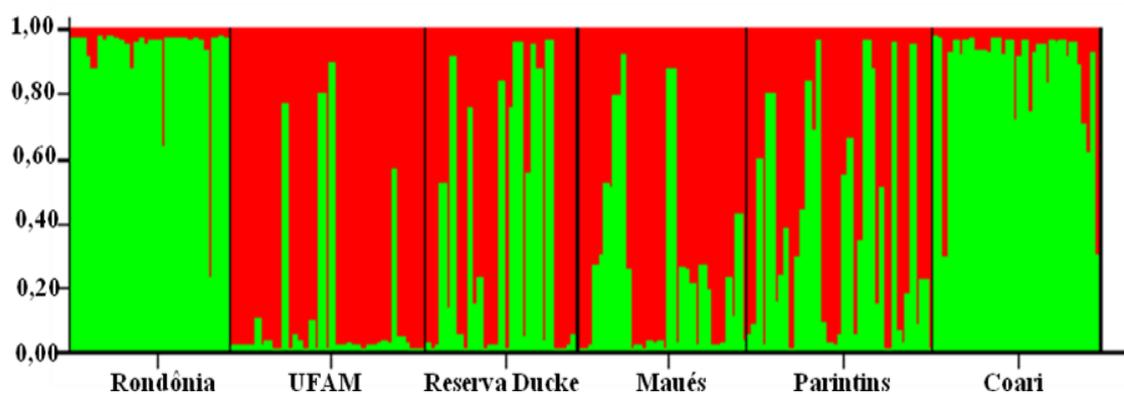


Figura 4. Probabilidade de associação das 195 plantas em dois grupos identificados pelo programa STRUCTURE ($\Delta K = 2$) para seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S. A. Mori com base em nove locos microssatélites. As cores representam os grupos com similaridades alélicas e cada planta (linha vertical) é avaliada em termos da probabilidade de compor um determinado grupo

O dendrograma baseado nas distâncias de Nei (1978) agrupado pelo método UPGMA (Figura 5) também mostrou a formação de dois grupos, o primeiro com dois subgrupos, um formado por UFAM e Reserva Ducke, e outro por Maués e Parintins; o segundo mostra as populações de Rondônia e Coari. O teste de bootstrap foi acima de 85% para todas as relações genéticas evidenciadas no dendrograma. O resultado demonstrou uma maior relação entre as populações de UFAM/Reserva Ducke e Maués/Parintins, e menor entre Rondônia/Coari com as demais, indicando que há relação entre distância genética e distância geográfica como observado nos testes de Mantel.

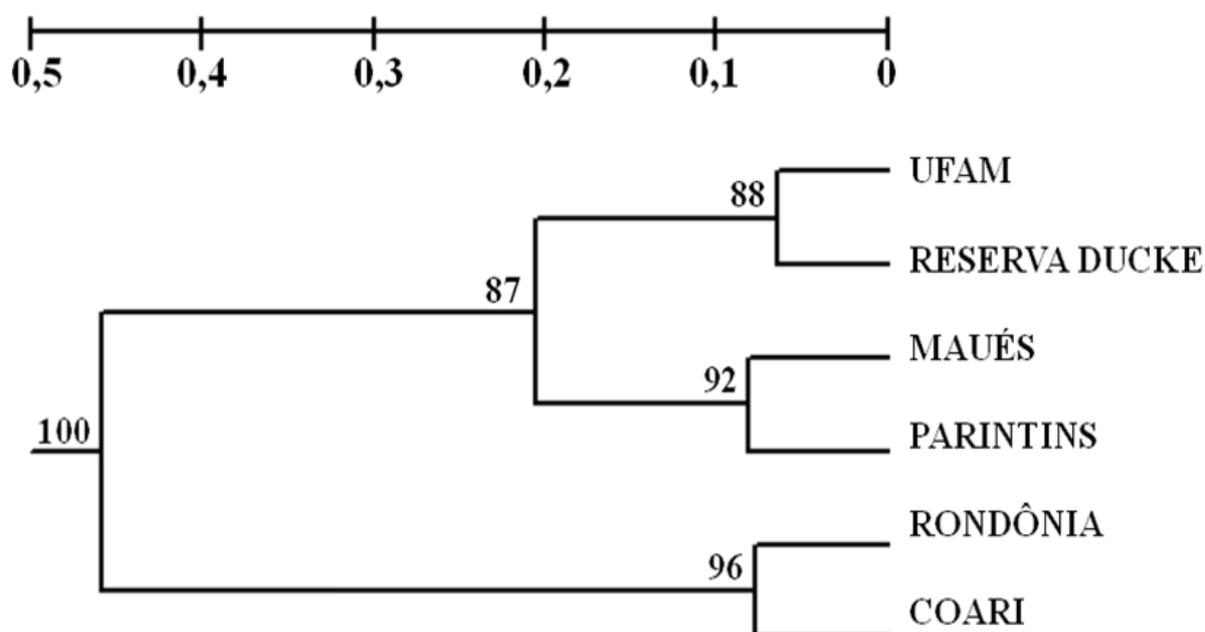


Figura 5. Dendrograma de distância de Nei (1978) agrupado por UPGMA, para seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) A. S. Mori (Teste de bootstrap de 10000 simulações, implementado pelo programa TFPGA)

O teste de Mantel confirmou que há relação entre distância genéticas e distâncias geográficas para as seis populações de *E. coriacea* na Amazônia Brasileira. O coeficiente

de correlação encontrado foi $r = 0,609$, foi significativo ($p = 0,036$), indicando que 61% da diferenciação genética observada nas populações pode ser explicada pela hipótese de isolamento por distância.

O padrão de isolamento por distância detectado aqui é consistente com os resultados obtidos em estudos com outras espécies florestais. Lemes *et al.* (2003) sugeriram estratégias de conservação *in situ* de *Swietenia macrophylla* King baseadas na preservação de grandes áreas de modo a minimizar a perda da diversidade decorrente de deriva genética. Segundo os autores, as populações de mogno na Bacia Amazônica estão estruturadas geneticamente e cada população comporta uma alta diversidade genética.

A diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações foi moderada e significativamente diferente de zero ($p < 0,05$) para todos os pares de populações analisadas (Tabela 3). A diferenciação genética foi menor entre Parintins e Maués (0,018), seguida pelas populações da UFAM e Reserva Ducke (0,030), provavelmente por serem geograficamente mais próximas. A maior diferenciação genética aqui observada foi entre as populações de Rondônia e UFAM (0,301).

O fluxo gênico entre as populações de Maués e Parintins foi alto ($Nm = 13,465$), seguido de Reserva Ducke e UFAM ($Nm = 8,197$), refletindo as baixas estimativas de F_{ST} (Tabela 3), que pode ser explicado pela proximidade geográfica. A população de Rondônia em relação às demais populações, com exceção de Coari, apresentou os menores valores de Nm , sendo menor com a UFAM ($Nm = 0,5$), sugerindo fluxo gênico restrito provavelmente por estarem mais distantes geograficamente.

Tabela 3 - Matriz de divergência (FST – diagonal abaixo) e fluxo gênico [M (número absoluto de migrantes) = $2Nm$ - diagonal acima] entre seis populações de *Eschweilera coriacea* (A.P. de Candolle) Mori, considerando nove locos microssatélites.

	Rondônia	UFAM	Reserva Ducke	Maués	Parintins	Coari
Rondônia	-	0,58	0,81	1,30	1,31	3,98
UFAM	0,30	-	8,19	2,95	2,19	0,90
Reserva Ducke	0,23	0,030	-	5,35	4,66	1,43
Maués	0,16	0,07	0,04	-	13,46	1,87
Parintins	0,16	0,14	0,05	0,018	-	1,93
Coari	0,05	0,24	0,15	0,19	0,14	-

3.4 CONCLUSÃO

Os nove marcadores microssatélites utilizados nestas análises mostraram alto conteúdo informativo, indicando a eficiência destes marcadores em estudos de diversidade e estrutura genética em *E. coriacea*. A presença de alelos privados a determinadas populações evidenciou a importância da manutenção de populações para que não haja perda de alelos e conseqüentemente, redução do nível de variabilidade genética. As estimativas de endogamia (f) foram significativamente diferentes de zero indicando que as populações apresentaram excesso de homozigotos, provavelmente devido ao sistema reprodutivo. A análise de variância molecular detectou que a maioria da variação genética detectada está contida dentro das populações, padrão este também observado para maioria das espécies de árvores neotropicais. Os valores de F_{ST} evidenciaram uma moderada diferenciação genética entre as seis populações de *E. coriacea*, indicando estrutura genética, que pode ser explicada por meio do isolamento por distância. O gráfico gerado pelo STRUCTURE apresentou o mesmo agrupamento na análise de dendrograma baseado em distâncias genéticas de NEI formando dois grupos, o primeiro formado por UFAM/ Reserva Ducke e Parintins/ Maúes, e o segundo por Rondônia/Coari, o qual se encontra menos relacionado com as demais populações indicando fluxo gênico restrito. Portanto, com base nos dados genéticos obtidos propõe-se que sejam conservadas diferentes populações naturais de *E. coriacea* com vários indivíduos por população, ao longo de sua distribuição, a fim de preservar a diferenciação genética observada entre elas, bem como a alta diversidade genética detectada dentro das mesmas, possibilitando a manutenção da variabilidade genética e a conservação efetiva dessas populações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados aqui gerados algumas considerações podem ser formuladas:

A presença de alelos privados nas populações evidencia a importância da manutenção das mesmas para que não haja perda de alelos e conseqüentemente redução do nível de variabilidade genética.

A maior parte da variabilidade concentra-se dentro de populações, sendo assim a coleta de indivíduos deve ser ampla e privilegiar várias populações, sem prejuízos da amostragem dentro das mesmas, portanto, para a manutenção da variabilidade da espécie *in situ*, o ideal é que várias áreas de conservação sejam estabelecidas.

A distribuição de *E. coriacea* se mostrou estruturada seguindo o modelo de isolamento por distância, sugerindo que a coleta de germoplasma para fins de coleção deva ser feita no maior número possível de populações naturais, evitando-se coletas em populações próximas geograficamente.

No entanto, sugere-se que populações de matamatá-amarelo em outras localidades da Amazônia sejam amostradas e submetidas a análise de diversidade genética e/ou abordagem filogeográfica, com marcadores moleculares, para gerar resultados consistentes quanto à distribuição e estrutura da variabilidade genética e histórico de colonização da espécie na Amazônia.

Ainda, há necessidades de outros estudos sobre biologia floral, ecologia de polinização e sistema de reprodução, que esclareçam melhor o comportamento da biologia da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZEN, M.A.; FEINSINGER, P. Forest fragmentation, pollination and plant reproduction in a chaco dry forest. Argentina. **Ecology**, v. 75, n. 2, p. 330-351, 1994.

ALCÂNTARA, B.K. Caracterização da diversidade genética de teca (*Tectona grandis*) de diferentes procedências usando marcadores microssatélites. 92p, 2009. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGA, P & KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, 7(8): 933-944. 1998.

ALVES, R.M. Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* wild. Ex. Spreng Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânicos-agronômicos. Piracicaba, 2002. 146p.: il.

ALVES, R.M.; ARTERO, A.S.; SEBBENN, A.M.; FIGUEIRA, A. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 373-379, 2003.

AMANCIO, A.B.; TELLO, J.C.R. Composição florística e estrutura da floresta densa aluvial (baixio) da área verde do campus da Universidade do Amazonas. Manaus. **Resumos. IX Jornada de Iniciação Científica - Universidade Federal do Amazonas. 2000.**

AMARAL, D.D.; VIEIRA, I.C.G.; ALMEIDA, S.S.; SALOMÃO, R.P.; SILVA, A.S.L.; JANDIM, M.A.G. Checklist da flora arbórea de remanescentes florestais da região metropolitana de Belém e valor histórico dos fragmentos, Pará, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 4, n. 3, p. 231-289, set.- dez. 2009.

ANDRÉ, T.J.C. Fluxo gênico e diversidade genética em uma população manejada de mogno (*Swietenia macrophylla*, King - Meliaceae) na Amazônia oriental. 46p. 2005. Dissertação (Mestrado) - Manaus: INPA/UFAM.

ANGRIZANI, R.C. Desenvolvimento e caracterização de marcadores de DNA microssatélites para *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae): uma espécie florestal amazônica ameaçada. 60p. 2007. Dissertação (Mestrado). Manaus: INPA/UFAM.

ASSUNÇÃO, N.S. Divergência genética em *Cedrela fissilis* Vell. obtida por marcadores RAPD. 29p. 2004. (Monografia) - Departamento de Ciências de Florestas Tropicais. Lavras: UFLA.

AULER, N.M.F. Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Baccharis trimera* (Less) (carqueja) no sul do Brasil. 108p. 2004. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria.

AZEVEDO, V.C.R. Desenvolvimento e aplicações, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara*

huberi (Ducke) Chev. Sapotaceae. 2007. 201p. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília.

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. **Journal of Heredity Advance**. p. 1-9. 2007.

BAJAY, M.M. Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização do germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.). Dissertação (Mestrado). Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2009. 96p.:il.

BARREIRA, S. Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish base para o manejo florestal. 2005. 61p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

BARRETT, S.C.H.; KOHN, J.R. Genetic and KU evolutionary consequences of small populations sizes in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. **Genetics and conservation of rare plants**. Oxford: Oxford University Press, p. 3-30, 1991.

BELKHIR, K.; BORSA P.; CHIKHI L.; RAUFASTE N. & BONHOMME F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France). 2004

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

BERNARDES, L.G. Diversidade genética de tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum* Mart.) com marcadores microssatélites. 2008. 43p. Dissertação (Mestrado). MANAUS. UFAM.

BISCAIA, A.E.; KANASHIRO, M.; SEBEN, A.M. Effects of reduced impact logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. **Forest Ecology and Management**, 255 (2008) 1034-1043p.

BILLOTE, N.; COUVREUR, T.; MARSEILLAC, N.; BROTTIER, P.; PERTHUIS, B.; VALLEJO, M.; NOYER, J.L.; JACQUEMOUD-COLLET, J.-P.; RISTERUCCI, A.M.; PINTAUD, J.-C. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p. 580–582, 2004.

BITTENCOURT, J.V.M. **Manual de biologia molecular em plantas arbóreas**. Curitiba: CBAB. 2008.

BORÉM, A. **Biotechnology florestal**. 1^oed. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 387p. 2007.

BORÉM, A. **Marcadores moleculares**. 1^oed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa,

374p. 2006.

BORÉM, A. **Pequeno glossário de termos agronômicos**. Viçosa: A. 169p. 1998.

BOTREL, M.C.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasil. Bot**, v.27, n. 4, p. 621-627, 2004.

BRAGA, A.C.; REIS, A.M.M.; LEOI, L.T.; PEREIRA, R.W.; COLLEVATTI, R.G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Mol. Ecol. Notes**. 7: 53-56, 2007

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v. 97, n. 5-6, p. 816-827, 1998.

BRONDANI, R.P.V.; GAIOTTO, F.A.; MISSIAGGIA, A.A.; KIRST, M.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn (Bombacaceae) na endangered tree species of the Amazon forest. **Mol. Ecol. Notes**, v.3, n.2, p. 177-179, 2003.

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

BUONAMICI, A.; CAVERS, S. VENDRAMIN, G.G. Microsatellite loci isolated from the tropical tree *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae). **Molecular Ecology Resource**, OnlineEarly Articles. 2008.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica**, 20, p.1-11, set. 2003.

CAMARGO, J.L.C; FERRAZ, I.D.K; MESQUITA, M.R.; SANTOS, B.A.; BRUM, H.D. **Guia de propágulos e plântulas da Amazônia**. Manaus: INPA. p.86-87. il. 2008.

CARNAVALE-BOTTINA, M. Análise da diversidade genética de populações de *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusaceae) utilizando marcadores AFLP. 88p. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CARVALHO, A.Z. Transferabilidade de microssatélites de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose. 52p. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas.

CARVALHO, M.G.; VELANDIA, R.J.; OLIVEIRA, L.F.E.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae), **Pharmaceutical Biology**. v. 37, n. 3, p. 208-215, 1999.

CASTELLEN, M.S. Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e auto correção

espacial. (Tese de Doutorado) Piracicaba. 104p.: il. 2005.

CAVALLARI NETO, M. Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lam (DC), por marcadores isoenzimáticos. 2004. 67p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura. Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

CAVALLARI, M.M. Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) no Estado de São Paulo. 128p. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.

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

CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, p. 455–476, 2000.

CHASE, M.R.; BOSHIER, D.H.; BAWA, K.S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. **American Journal of Botany**, v. 82, p. 468-475, 1995.

CIAMPI, A. Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para copaifera langsdorfii Desf. (Copaíba) Leguminosae-Caesalpinioideae**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2000. 40p.

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 trees species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, London, v.83, n. 6, p.784-756, 1999.

CONTE, R. Estrutura de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozimáticos e microssatélites. 124p, 2004. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura. Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo Piracicaba.

CRISTO-ARAÚJO, M. Uma coleção nuclear de pupunha na Amazônia brasileira. 94p. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus: UFAM.

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K. & KESSELL, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology** 8: p, 1585 – 1592, 1999.

DE WOODY, J.A., SCHUPP, J.; KENEFIC, L.; BUSCH, J.; MURFITT, L.; KEIM, P. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. **Biotechniques** 37, 2004. p.348-352.

DICK, C.W. & HAMILTON, M.B. Microsatellites from the Amazonian tree *Dinizia excelsa* Ducke (Fabaceae). **Mol. Ecol. Notes**, 8, 1753–1768. 1999.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.I. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

DUDASH, M.R.; FENSTER, C.B. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In: YOUNG, A.G.; CLARKE, G.M. **Genetics, demography and viability of fragmented populations**. Cambridge University Press, 2000, p. 35-53.

DUTECH, C.; SORK, V.L.; IRWIN, A.J.; SMOUSE, P.E.; DAVIS, F.W. Gene flow and fine-scale genetic structure in a wind-pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, n. 2, p. 252-261, 2005.

EISEN, J.A. Mechanistic basis of microsatellite instability, in: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (ed.) **Microsatellite: Evolution and application**. Oxford: University Press, oxford. p. 34-48, 1999.

ESTOPA, R. A.; RAMALHO, M. A. P.; REZENDE, G.D.S.P.; ABAD, J. I. M.; GONÇALVES, F M. A. Desempenho dos descendentes de clones de *Eucalyptus* spp. autofecundação e cruzados. **Revista Cerne**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 264-270, 2007.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.G.L.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p. 47-50, 2006.

FALCONE, D.S.; MACKAY, T.F. **Introduction to quantitative genetics**. London: Logman, 464p. 1997.

FARIAS, G. S. Estrutura genética de populações e filogeografia da acariquara (*Minquartia guianensis* Aubl., Olacaceae). 2010. 84p. Dissertação (Mestrado). INPA. Manaus.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: CENARGEN / EMBRAPA, 220p. 1998.

FIORATTI, A.B.; GEBARA, K.S.; LIMA, M.M.S.; CARDOSO, M.L.C. Avaliação da atividade antioxidante de *Eschweilera* sp. e desenvolvimento de cosmecêuticos contendo extratos naturais. **I Congresso de Farmácia de Maringá**. 2006. Arq Mudi. 2007; 11(Supl 1). [Resumos]

FRANCESCHINELLI, E.V.; BAWA, K.S. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). **Heredity**, London, v. 84, n. 1, p. 116-123, 2000.

FRANKHAN, R.; LEES, K.; MONTGOMERY, M.E.; ENGLAND, P.R.; LOWE, E.H.;

BRISCOE, D.A. Population size bottlenecks reduce evolutionary potential? **Animal Conservation**, v. 2, p. 255-260, 1999.

FREITAS, V.C.M.; SILVA, C.E.; ANTONIO-FILHO, P.S.S.; ARRUDA, A.C. Estudo alelopático e antimicrobiano de folhas de *Eschweilera* sp e *Mabea fistulifera*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). **Resumos**. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005.

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva**. FUNPEC, 2^a ed. Ribeirão Preto - São Paulo. 631p. 2002.

GAIOTTO, A.F. Inferências sobre heranças quantitativas e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. utilizando marcadores microsatélites. 2001. 122p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

GLAUBITZ, J.C. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p. 309-310, 2004.

GOIS, I.B.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R.A. Variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população do baixo São Francisco sergipano, por meio de isoenzimas Genetic variability of *Spondias lutea* L. in a population located in the Lower San Francisco, Sergipe State, by isozyme markers. **Sci. For.** Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 55-60, 2009.

GONÇALVES, N.A. Estrutura e diversidade genética de populações naturais de *Ficus* spp. (Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo. 107p. 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

GONELA, A. Análise da estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais e respectivas progênes de *Copaifera langsdorffii* Desf. utilizando marcadores microsatélites. 2005. 83p. (Tese Pós-Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation índices (software). version 2.9.3.2, 2002. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 3 setembro de 2010.

GOUVÊA, L.R.L.; RUBIANO, L.B.; CHIORATTO, A.F.; ZUCCHI, M.I.; GONÇALVES, P.S. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. **Genet. Mol. Biol.** vol.33 n^o.2 São Paulo. 2010.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C. *GELBART, W.M. Introdução à Genética*, 7^a ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002,794p.

GUSSON, E.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 67, p. 123-135, 2005.

GUSSON, E.; SEBEN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.4, 2006. p.491-502.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. **Genetics and Conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, p. 335-348, 1983.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sinauer: Sunderland, p. 43-63, 1989.

HARTL, D.L. **Princípios de Genética de População**. FUNPEC – Editora, 3ª ed. Ribeirão Preto –SP. 542p. 2010.

HOLANDA, F.J. Caracterização genética de *Solanum crinitum* Lam. das Regiões de Rondônia e Amazonas. Tese (Doutorado). 87p. 2010.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, 11 (10), p. 424-429, 1996.

KAGEYAMA, P.Y. Genetic structure of tropical tree species of Brazil. In: BAWA, K.S.; HADLEY, M. (Eds.) **Reproductive ecology of tropical forest plants**. Paris: UNESCO, p. 383-392, 1990.

KALINOWSKI, S.T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 539-543, 2004.

LACERDA, C.M.B.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Allemão na região semi-árida, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n°2, p. 145-150, 2003.

LEMES, M.R. Population genetic structure and mating system of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) in the Brazilian Amazon: Implications for conservation. 2000. 167p. Thesis (Doctor Philosophy) - University of Stirling, Stirling, UK.

LEMES, M.R.; BRONDANI, R.P.V. E 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**, 93(4): 287-291. 2002.

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

LEOI, L.C.T. Desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSR) em *Arachishypogaea*.

145p. 2003. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília.

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**, Oxford, v. 12, n. 12, p. 3219-3225, 2003.

LOPES, M.A. A dispersão de sementes e a estrutura de populações de matamatá branco (*Eschweilera coriacea*, Lecythidaceae) na Amazônia oriental - um estudo de caso. **In: A Primatologia no Brasil - 9** (S.F. Ferrari & J. Rímoli, Eds.) Aracaju, Sociedade Brasileira de Primatologia, Biologia Geral e Experimental – UFS. 2008.p. 94-108.

LOUREIRO, A.A.; SILVA, M.F.; ALENCAR, J.C. Essências madeireiras da Amazônia. **Manaus**. INPA. 1979.

MADY, F.T.M. Características anatômicas e tecnológicas para um melhor aproveitamento comercial de *Eschweilera coriacea* (A.P. de Candolle) Mori (Fam. Lecythidaceae). 32p. 1998. (**Monografia**). UFAM.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**. 27: 209-220. 1967.

MARSHALL D.K.; BROWN, A.H.D. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: O.H. FRANKEL & J.G.R. HAWKES (Eds.). **Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow**. Cambridge: Cambridge University Press, 1975. p.53-70.

MARTÍNEZ, A.K.; GAÍTAN-SOLIS, E.; DUQUE, M.C.; BERNAL, R.; TOHME, J. Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. **Molecular Ecology**, v.2, p.408-410, 2002.

MARTINEZ, M.L.L. Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados *ex situ* no Banco de Germoplasma da Floresta da USP de Ribeirão Preto. 126p. 2008.

MARTINS, P. S. estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "*in situ*" **IPEF**, n. 35, p. 71-78, 1987.

MEDEIROS, A.C.B. Desenvolvimento, caracterização e estimativa de erros de genotipagem de locos microssatélites de *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). 2006. 108p. Dissertação (Mestrado).

MENICUCCI, T.A. Filogeografia e estrutura genética de populações da Mungubeira (*Pseudobombax Munguba* (Mart. & Zucc.) Dugand, Malvaceae – Bombacoideae. 67p. 2007. Dissertação (Mestrado) - Manaus : INPA/UFAM.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. **Genetics**, v. 142, p.1061–1064, 1996.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. UFRGS, Porto Alegre, 141p. 1998.

MILLER, M.P. Tools for population genetic analysis (TFPGA), version 1.3.[S.l.]: Northern Arizona University, 1997.

MORAES, M.L.T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão. Anarcadiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler). 139p. 1992. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All sob diferentes condições antrópicas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 281-289, 2005.

MOREIRA, R.F.C. Estrutura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* e *moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR. 128p. 2006. Tese (Doutorado) - Unesp, Campus de Jaboticabal.

MORENO, M.A. Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no cerrado do Estado de São Paulo. 115p. 2009. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura. Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

MORI, S.A.; PRANCE, G.; BOLTEN, A.B. Additional notes on the floral biology of neotropical Lecythidaceae. **Brittonia** 30: 113–130, 1978.

MORI, S.A. Biologia da polinização em lecythidaceae. **Acta bot. bras.** 1(2):121-124. supl 1988. p.121-124.

MORI, S. A.; PRANCE, G. Taxonomy, ecology, and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* . Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). In **Advances in Economic Botany**. New York. v. 8, p. 130 - 150. 1990.

MORI, S.A. Diversificação e conservação das lecythidaceae Neotropicais. **Acta botânica Brasileira**. v. 4, p.45-68, 1990.

MORI, S.A.; PRANCE, G.T. Flora neotropica Lecythidaceae. New York. **Botanical Garden**. (monograph 21). 370p. 1990.

MUCHUGI, A. et al. Estimation of out-crossing rate in a natural breeding population of *Warburgia ugandensis* using AFLP marker. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.2, p.139-146, 2008.

MURAWSKI, D.A. et al. Mating system of two Bombacaceous trees of a neotropical moist forest. **Oecologia**, v. 82, p. 501-506, 1990.

MURAWSKI, D.A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy

- perspective. In: LOWMAN, M.D.; NADKARNI, N.M. (Ed.). **Forest canopies**. New York: Academic Press, 1995. p. 457-493.
- NASON, J.L.; ALDRICH, P.R. & HAMRICK, J.L. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In: LAURANCE, W.F. (Ed.). **Tropical forest Remnants**. In press, p. 304-320, 1996.
- NAZARENO, A. G. Estrutura e diversidade genética de populações naturais de *Ficus* spp. (Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo. 107p. 2009. Dissertação (Mestrado) - Ribeirão Preto/ USP.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York. 1987.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.
- PICANÇO, D.B.; SOUZA, N.R.; CLEMENT, C.R.; NAGAO, E.O.; ASTOLFI-FILHO, S. Discriminação de raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes*) na Amazônia brasileira com marcadores moleculares (RAPDs). In: Congresso Nacional de genética, 45p. 1999 - **Theor. Appl. Genet** Gramado, RS.
- PINTO, S.I.C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas **Rev. bras. Bot.** vol.27 n. 3. São Paulo. 2004.
- PINTO, S.I.C.; SOUZA, A.M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 40-48, 2004.
- Plano de Operação anual – POA**. Precious Woods Amazon. 34p. 2005
- POTASCHEFF, C.M. Ecologia da polinização de *Eschweilera nana* Miers., uma Lecythidaceae do Cerrado. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 2010. 53p.
- PRANCE, G. T.; MORI, S. A. Observations on the fruits and seeds of neotropical Lecythidaceae. **Brittonia**, v. 30, p. 21-33, 1978.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945–959, 2000.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, W. 2003. **Documentation for the structure software**, Version 2. Department of Human Genetics, University of Chicago, USA.
- RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A.Y.; WADT, L.H.O.; VEASEY, E.A. Diversidade genética de populações de andiroba no baixo Acre. **Pes. Agrop. Bras.** v. 42, n.9. Rio Branco. p.1291-1298, 2007.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REIS, V.M. Relações genéticas entre raças e populações da coleção nuclear de pupunha (*Bactris gasipaes* kunt) avaliadas com microssatélites. 86p. 2009. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, UFAM. Manaus.

RESENDE, M.D.V. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, p. 589-647, 1999.

RIBAS, L.A. Diversidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de duas espécies pioneiras arbóreas. 102p. 2003. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A. S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. INPA-DFID, Manaus. 800 p. 1999.

RICE, R.W. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v.43, p. 223-225, 1989.

RODRIGUES, D.P. Diversidade genética e sistema de reprodução em progênies elites de pupunheira inerme (*Bactris gasipaes* kunth) com marcadores microssatélites: implicações para o melhoramento do palmito. 105p. 2007. Tese (Doutorado) - PPG Biotecnologia. UFAM. Manaus-Amazonas.

ROSA, A.C. Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para a mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) – Diptera: Muscidae. 82p. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Campinas, São Paulo.

SALOMÃO, R.P.; ROSA, N.A.; NEPSTAD, D.C.; BAKK, A. ESTRUTURA DIAMÉTRICA E BREVE CARACTERIZAÇÃO ECOLÓGICA ECONÔMICA DE 108 ESPÉCIES ARBÓREAS DA FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA - I. INTERCIENCIA 20(1): 20-29. 1995. (Acessado em 13/08/2011 <http://www.interciencia.org.ve>)

SCHLOTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**. v. 20, n. 2, 215p. 1992.

SCHIMIDT, A.B.; CIAMPI, A.Y.; GUERRA, M.P. E; NODARI, R.O. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Mol. Ecol. Notes**, 7(2): 340–342. 2007.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v.18, p.233-234, 2000.

SEBBENN, A.M; KAGEYAMA, P.Y. ; VENCOUSKY, R. Conservação genética *in situ* e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis**. N. 63. p. 13-22, 2003.

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

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers, **Ecology Letters**, v.9, n.5, p.615-629, 2006.

SERAFINI, R.T. Estrutura de fragmentos florestais urbanos de Manaus-AM: implicações para seu manejo e conservação. Dissertação (mestrado), INPA/UFAM, Manaus, 2007. 95p.

SIGRIST, M.S. Divergência genética em *Curcuma longa* L. utilizando marcadores microssatélites e agromorfológicos. 82p. 2009. Dissertação (Mestrado) - Área de Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia. Instituto Agrônomo Campinas.

SILVA, E.S. Análise dos aspectos socioeconômicos, fito-demográficos, genéticos e físico-químicos da extração do óleo-resina de *Copaifera reticulata* em duas comunidades da FLONA do Tapajós, Pará. Tese (Doutorado), Biotecnologia/UFAM, Manaus, 2011. 100p.

SILVA, K.E.; MATOS, F.D.A.; FERREIRA, M.M. Composição florística e fitossociologia de espécies arbóreas do Parque Fenológico da Embrapa Amazônia Ocidental. **Acta amaz**, 38(2), p. 213-222, 2008.

SILVA, M. B.; AZEVEDO, V. R.; SILVA, V. P.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y. Avaliação da diversidade genética de uma população natural de tatajuba *Bagassa guianensis* Aubl. (Moraceae): uma espécie madeireira tropical. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 3p. (Comunicado Técnico, 105).

EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF, 2004.

SHIMIZU, J.Y. Estratégia complementar para conservação de espécies florestais nativas: resgate e conservação de ecótipos ameaçados. **Pesq. Flor.bras.** Colombo, n. 54, p. 07-35. 2007.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, 139(1):457-62. 1995.

SOUZA, L.M.F.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBEN, A.M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p.70-79, 2004.

SOUZA, R. G. V. C. Importância da conservação *in situ* de *Copaifera langsdorffii* Desf. em remanescentes de cerrado de propriedades rurais. Dissertação(Mestrado), Piracicaba. 2011. 78p.

STEPHAN, W.; CHO, S. Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. **Genetics**, 136 (1): 333-341. 1994.

STEVENSON, P.R. The relationship between fruit production and primate abundance in

neotropical communities. **Biological journal of the Linneum Society**, n.72, p. 161-178, 2001.

SUJII, P.; MARTINS, K.; WADT, L.; AZEVEDO, V.; SOLFERINI, V. Genetic diversity of *Bertholletia excelsa* an Amazonian species of wide distribution. Iufra Tree Biotechnology Conference, **Resumos**. From genomes do integration and delivery Arraial d'ajuda - Bahia – Brazil, 2011. p.25 e 26..

TELLO, J. C.R.; IRMÃO, M. N.; VIANA, A.L.; BEZERRA, S.A.S.; CASTRO, J. P.; Composição florística e estrutura fitossociológica da floresta ombrófila densa sub montana (Platô) face à elaboração do plano de gestão ambiental da área verde do Campus da Universidade Federal do Amazonas. **Revista Forestal Venezuelana**, Ano XLII, Volume 52(2) Julho-Dezembro, 2008, p.149-158

TELLO, J.C.R. Aspectos fitossociológicos das comunidades vegetais de uma topossequência da Reserva Florestal Ducke do INPA. 335p. 1995. Tese (Doutorado) - Manaus: INPA/UFAM.

RAGOT, M.; HOISINGTON, D .A. Molecular markers for plant breeding: comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs, **Theor Appl Genet** v. 86, p. 975–984, 1993.

VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Brazilian Journal of Genetics**, v.17, n.3, p. 349-351, 1994.

VERAS, Y.T. Estrutura genética de *Carapa guianensis* aubl em diferentes habitats da amazônia central. 2011. 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Amazonas.

VERON. V.; CARON, H.; DEGEN, B. Gene flow and mating system of the tropical tree *Sextonia rubra*. **Silvae Genetica**. 54, 6. p. 275-280, 2005

VIANA, J.M.S.; CRUZ, C.D.; BARROS, E.G. **Genética**. Ed. UFV. v. 1, 275p. 2003.

VIEGAS, M.P. Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista. 2009. 69p

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**. 5, p. 33–34, 2005

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

VOS P.; HOGERS, R; BLEEKER M.. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23, p. 4407-4414. 1995.

WADT, L.H.O. Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* c.dc.) visando seu uso e conservação. 95p. 2001. Tese (Doutorado) - Escola

Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. 1992. <http://delta-intkey.com> acessado em 15 agosto de 2011.

WEIR, B.S. **Genetic data Analysis II: methods for distances Population Genetic Data**. Sunderland: Sinauer Associates, 445p. 1996.

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

WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humulis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 851- 860, 1997.

WHITLOCK, M.C.; MCCAULEY, D.E. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$. **Heredity**, v.82, p. 117-125, 1999.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R. ; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acid Res.**, v. 18, p. 653-6535, 1990.

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

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, v.19, p. 395-420, 1965.

YANG, S.-W., B.-N. ZHOU, WISSE JH, R. EVANS, H. **J. Nat. Prod.** 61. p. 901-906, 1998.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A.; MELLO JÚNIR, J.R.S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 114-119, 2004.

ZUCCHI, M.I. Análise da estrutura genética da *Eugenia dysenterica* utilizando marcadores RAPD e SSR. 130p. 2002. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

ANEXO 1 - CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EM ESTUDO

1.1 BR-429 Estado de Rondônia

Na Rodovia BR-429 foram coletadas folhas e câmbio (pedaços do tronco) de 31 indivíduos de *Eschweilera coriacea* (Figura 1). Essa rodovia está situada no oeste do Estado de Rondônia e no seu trecho inicial, do km 0,0 até o km 41,9, entre Ji-Paraná e o entroncamento com a Rodovia 477, ela é coincidente com a BR-364/RO, encontrando-se pavimentada até o município de Alvorada do Oeste/RO. Os locais de coleta foram apenas no segmento não pavimentado e foi do km 94,9 até o município de Costa Marques/RO, no km 385,9, na fronteira Brasil/Bolívia.

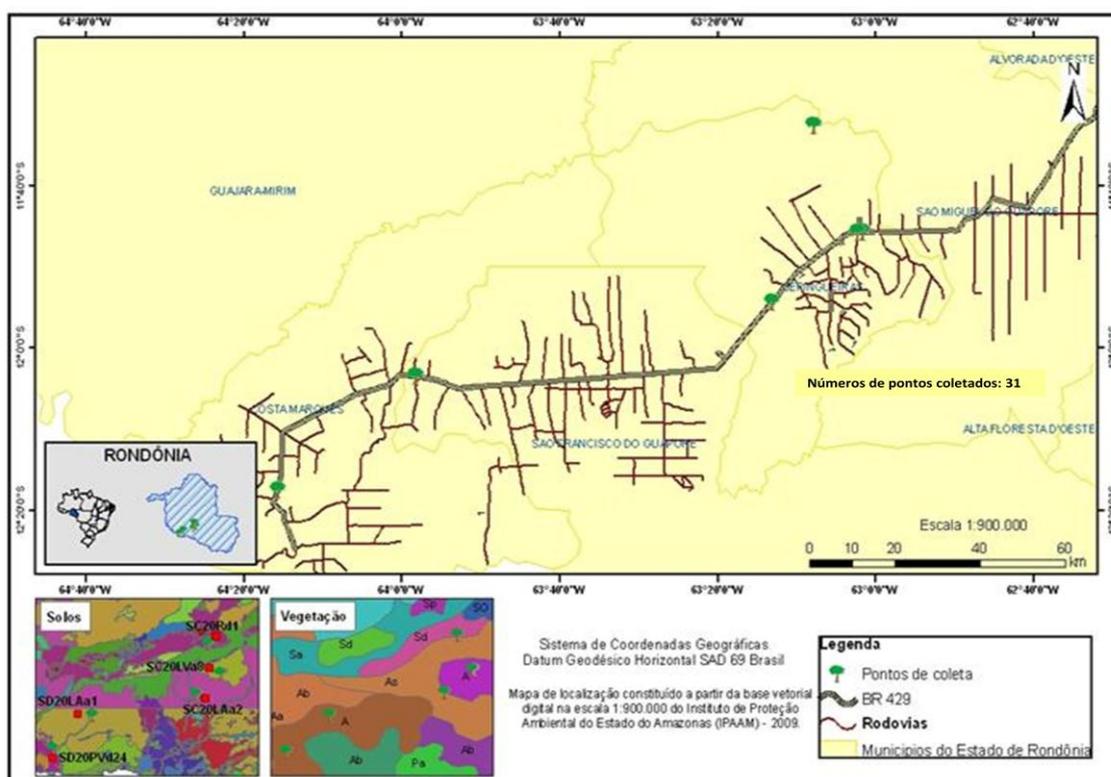


Figura 1. Coleta da *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori ao longo da BR-429 no Estado de Rondônia, caracterização do solo e vegetação

Nas áreas de influência da rodovia, encontram-se três tipos de vegetação: Floresta Ombrófila Aberta ocupando uma parte maior do trecho, Floresta Ombrófila Densa, em pequena escala, nas proximidades do município de Costa Marques e nas proximidades de

Alvorada do Oeste. As áreas de florestas estão altamente degradadas (Figura 2 A e B), o que gerou uma redução das áreas com vegetação nativa, a fragmentação de habitats, a perda de biodiversidade, o afugentamento da fauna, o isolamento de indivíduos arbóreos, o assoreamento de cursos d'água, dentre outros impactos ambientais.



Figura 2. A) Fragmento de vegetação nativa observado nas margens da rodovia. B) Áreas utilizadas para pastos ao longo da BR 429 (Fotos: Amancio, 2009).

1.2 Município de Manaus

A área de estudo abrangeu fragmentos florestais da zona urbana do Município de Manaus, localizada nas coordenadas geográficas 03°06'07" de latitude Sul e 60°01'30" de longitude Oeste, a uma altitude de 92,9 metros (IBGE, 2005). Apresenta características de clima equatorial úmido, com temperaturas médias anuais sempre acima de 22 °C, precipitação abundante (~2500 mm), radiação intensa e elevada umidade relativa do ar. Os tipos de vegetação encontrados em Manaus são predominantemente as florestas de terra firme (majoritárias), as florestas de várzea e as de igapós (SERAFINI, 2007). As regiões escolhidas para o estudo foram:

- (i) **Campus Universitário da UFAM:** Foram coletadas folhas e câmbios de 33 indivíduos de *E. coriacea* na Floresta Ombrófila Densa (Platô) (Figura 3). Essa floresta é considerada uma das maiores áreas verdes urbanas da América Latina, representando

aproximadamente 25% do total das áreas verdes públicas institucionais existentes na cidade de Manaus-Amazonas, sendo um dos poucos fragmentos florestais com grande dimensão (670 hectares) localizado no perímetro urbano da cidade, na região Leste da cidade, no bairro Coroado, entre as avenidas General Rodrigo Octávio Jordão Ramos e Autaz Mirim, sob as coordenadas geográficas 3°05'28" latitude Sul e 59°57'57" longitude Oeste (SERAFINI, 2007). A área comporta diferentes tipos de solo, encontrando-se Latossolo Amarelo Distrófico Álico de textura muito argilosa, transições podzolizadas Amarelo-avermelhadas, Distróficos Álicos, Podzóis de areia branca e podzóis hidromórficos (TELLO *et al.*, 2008).

(ii) Reserva Florestal Adolpho Ducke: Está localizada a cerca de 30 km ao norte da cidade de Manaus, na rodovia AM-10 Manaus-Itacoatiara. É uma área pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA desde 1963. Possui uma extensão de 100 km² (10.000 ha) entre as coordenadas 59°52'40" e 59°58'00" de longitude Oeste e 03°00'00" e 03°08'00" de latitude Sul (TELLO, 1995). Os tipos de florestas que ocorrem são quatro: platô, vertente, campinarana e baixio. Ocorre também vegetação secundária nas bordas e arredores sob a qual encontra-se a bacia hidrográfica do igarapé Bolívia, localizada na zona sul da reserva. Para esse estudo foi coletado, o material do tronco (câmbio) de 30 indivíduos de *Eschweilera coriacea* (Figura 4), em um ambiente com vegetação típica de platô.

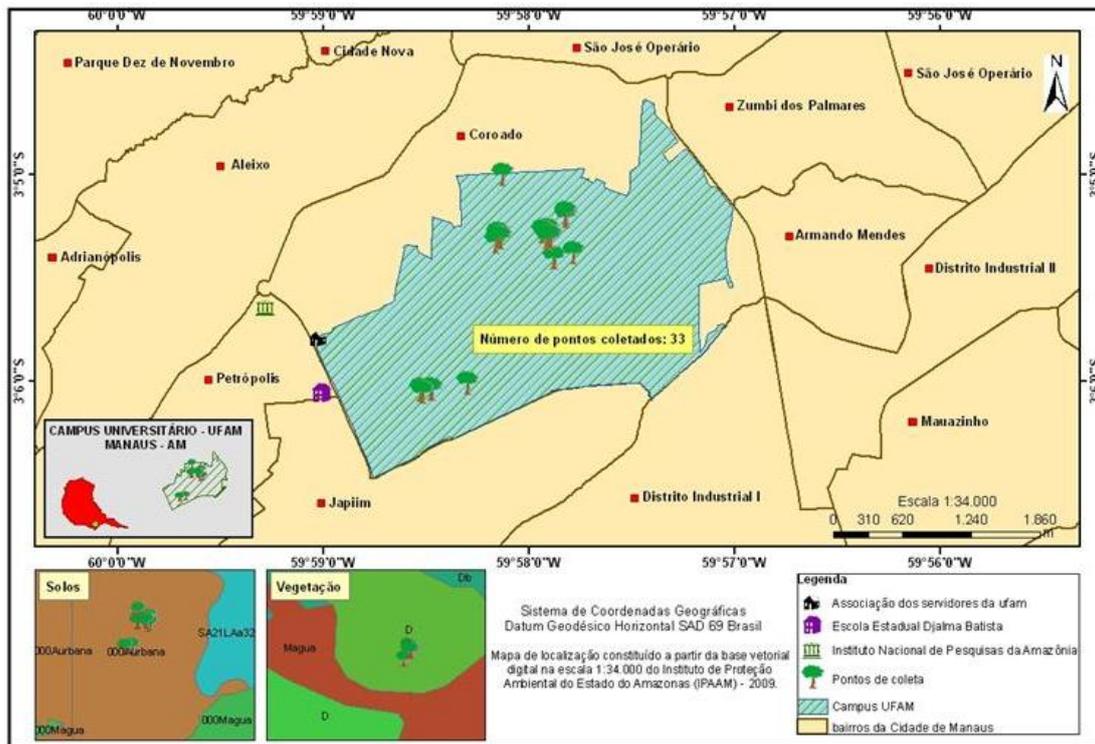


Figura 3. Coleta da *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori no fragmento florestal do Campus da Universidade Federal do Amazonas, caracterização do solo e vegetação.

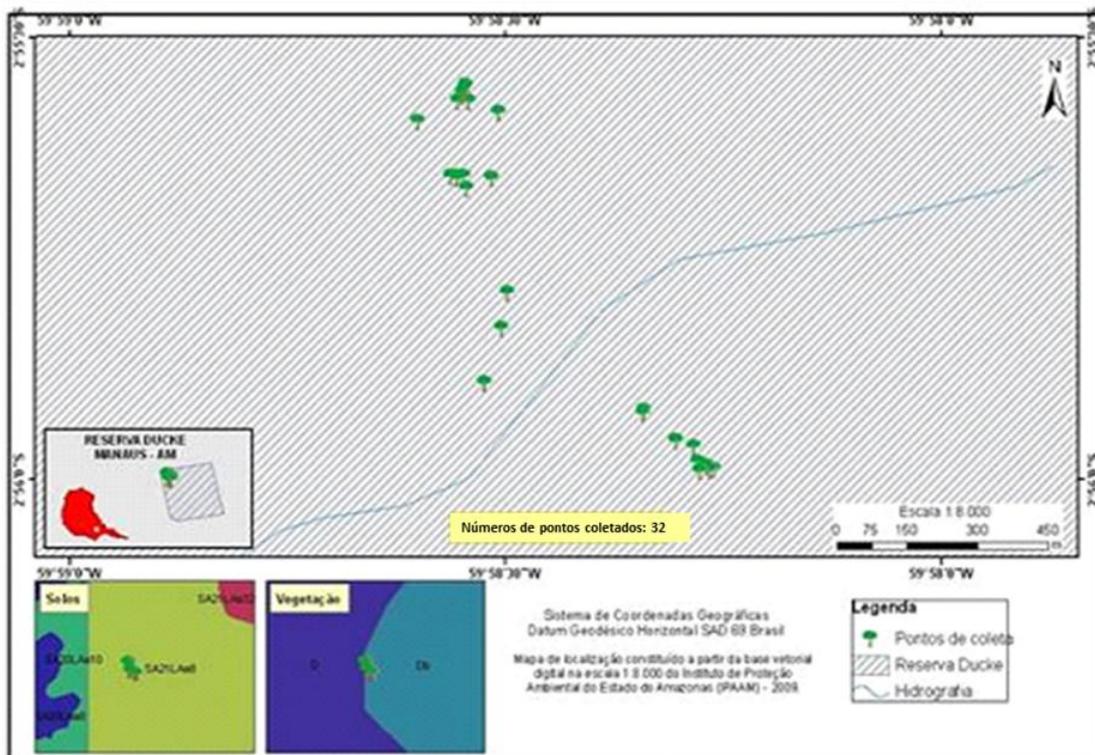


Figura 4. Coleta da *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori no Reserva Adolpho Ducke, caracterização do solo e vegetação

1.3 Município de Coari

As amostras de câmbio de 33 indivíduos de *Eschweilera coriacea* foram coletadas na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas em Coari/AM, localizada no perímetro urbano da cidade, entre o lago Mamiá e o lago de Coari, nas coordenadas 4° 06' 22" Latitude Sul e 63° 03' 21" Longitude a Oeste de Greenwich (Figura 5). A vegetação é constituída de grandes árvores e arbustos de terra firme, várzea de igapó e vegetação aquática, no entanto, a área de coleta foi na Floresta ombrofila Densa.

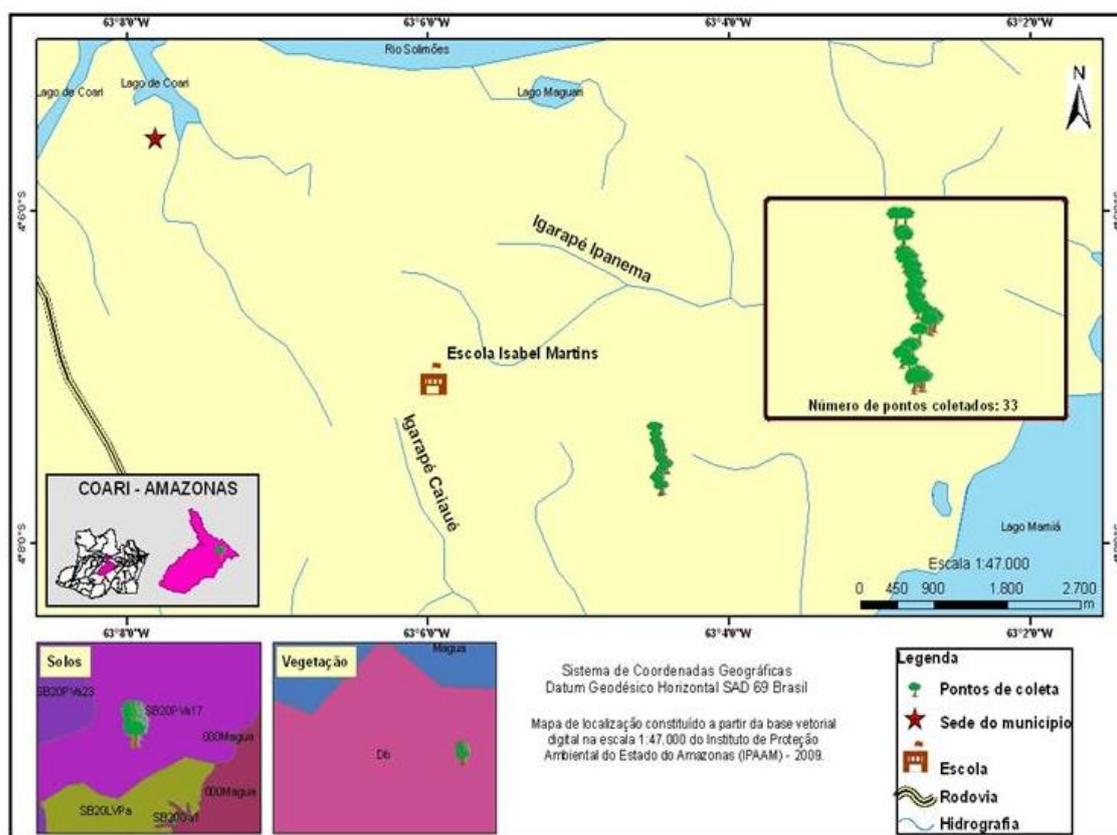


Figura 5. Coleta da *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas em Coari, caracterização do solo e vegetação

1.4 Município de Maués

Na região de Maués/AM foram escolhidas duas áreas (Fazenda Santa Helena e comunidade Vera Cruz) para a coleta de 35 amostras de *E. coriacea*. A Fazenda Santa Helena da empresa de refrigerantes AmBev possui mil hectares de terras, onde 50% são utilizadas para o estudo do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e a outra metade da área é reserva legal. A comunidade Vera Cruz está localizada do outro lado da margem da cidade de Maués (Figura 6). Os pontos de coleta são numa floresta compostas por uma vegetação constituída de árvores perenifoliadas, onde dominam as formas biológicas fanerófitas ombrófilas em todos os estratos. Nas coordenadas 3° 27' 22" latitude sul e 57° 38' 97" longitude Oeste de Grenwich.

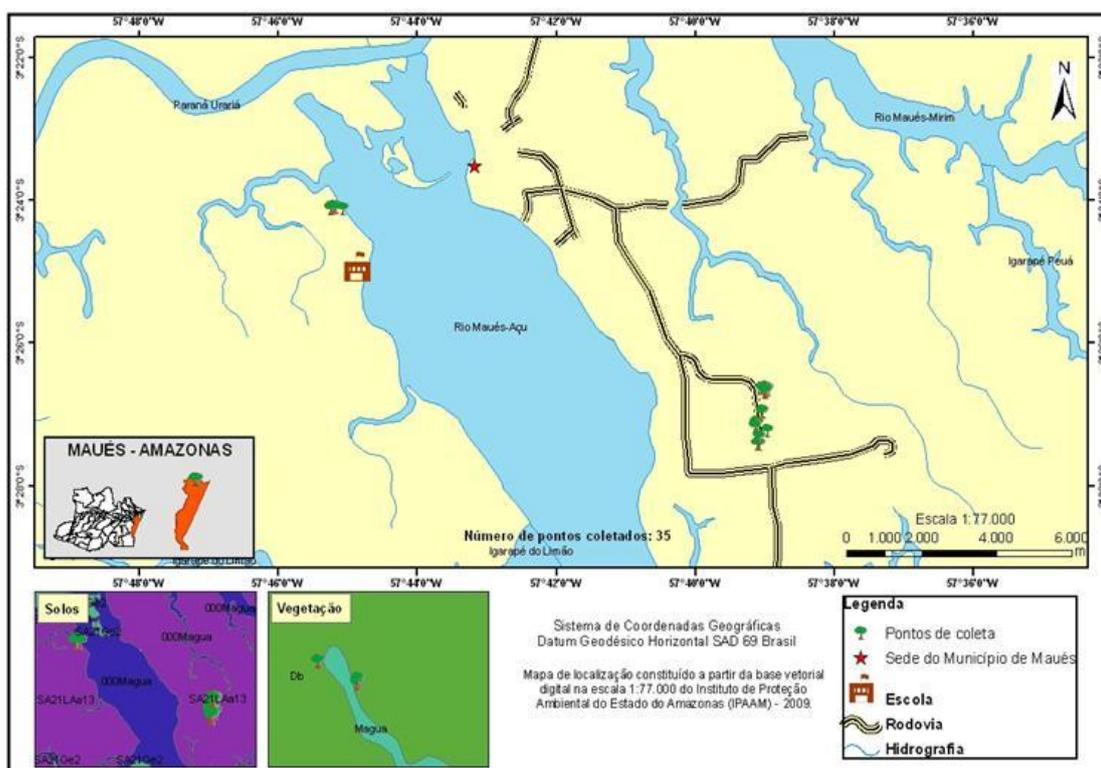


Figura 6. Coleta da *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori no município de Maués (Fazenda Santa Helena da AmBEV e comunidade de Veracruz)

ANEXO 2 . INVENTÁRIO DAS POPULAÇÕES COLETADAS

Tabela 1. Dados e informações dos indivíduos de *Eschweilera coriacea* (DC.) S. A. Mori coletados em Rondônia (BR-429), no período de 15 a 19 de setembro de 2008, onde: **VA = vitalidade das árvores**, sendo (1) Árvore sadia e copa bem desenvolvida; (2) Árvore com aspecto doentio e copa medianamente desenvolvida; (3) Árvore atacada por insetos e fungos e copas defeituosas; **CAP = circunferência à altura de 1,30 metro do solo**; **QF = qualidade do fuste**, sendo (1) Fuste Reto, cilindro e sadio, (2) Fuste com algum aproveitamento, (3) Fuste Tortuoso; **HT = altura total da árvore**, em metros; **HC = altura comercial da árvore**, em metros; **FF = fenofase**, sendo (FL) Floração, (FT) Frutificação, (TF) Troca de folhas, (FN) Folhas novas; **PS = posição sociológica**, sendo: (1) Emergente, (2) Dominante, (3) Co-dominante, (4) Dominada, (5) Sub-bosque

Nº	Latitude S (°)	Longitude W (°)	VA	CAP (cm)	QF	HT (m)	HC (m)	FF	PS
1	12,29097	64,26231	1	20	1	7	5	FN	4
2	12,29097	64,26231	1	140	1	23	19	FN	2
3	12,05847	63,97090	3	160	2	14	12	FN	2
4	12,05847	63,97090	4	30	1	8	5	FL	3
5	12,05777	63,97273	1	34	1	7	5	FN	3
6	12,05847	63,97090	2	42	3	11	7	TF	3
7	11,90570	63,22011	1	36	1	8	5	FN	3
8	11,90570	63,22011	1	42	1	8	5	FL	4
9	11,76227	63,02787	1	56	1	20	17	TF	2
10	11,76211	63,02861	1	60	1	12	9	TF	3
11	11,76196	63,02856	3	30	3	6	4	FN	4
12	11,76190	63,02850	2	80	2	15	8	TF	2
13	11,76182	63,02844	1	32	1	8	5	FN	3
14	11,76181	63,02842	1	33	1	7	6	FN	4
15	11,76186	63,02839	1	31	1	5	4	FN	4
16	11,76184	63,02839	1	53	1	15	13	TF	2
17	11,76187	63,02848	1	60	1	9	7	TF	2
18	11,76179	63,02857	3	45	3	8	6,5	TF	3
19	11,76185	63,02873	2	29	2	5	3	FV	4
20	11,76183	63,02898	1	80	1	16	14	FV	2
21	11,76188	63,02893	1	93	1	12	10	FV	2
22	11,76173	63,03877	1	40	1	9	7	FV	4
23	11,54356	63,13225	1	38	1	10	6	FN	4
24	11,54354	63,13229	1	31,5	1	5	3	FN	4
25	11,54353	63,13230	1	32	1	8	5	FN	4
26	11,54329	63,13218	1	31	1	12	7	FN	4
27	11,54322	63,13217	1	33,3	1	6	4	FV	4
28	11,54330	63,13219	1	34,2	1	7	4	FV	4
29	11,54337	63,13218	1	33,6	1	8	5	FV	4
30	11,54333	63,13217	1	31	1	10	3	FV	4
31	11,54333	63,13217	1	30	1	9	7	FV	4

Tabela 2. Dados e informações dos indivíduos de *Eschweilera coriacea* (CD.) S.A. Mori coletados em Manaus-AM, no Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), nos dias 02 e 03 de dezembro de 2008, onde: **VA = vitalidade das árvores**, sendo (1) Árvore sadia e copa bem desenvolvida, (2) Árvore com aspecto doentio e copa medianamente desenvolvida, (3) Árvore atacada por insetos e fungos e copas defeituosa; **CAP = circunferência à altura de 1,30 metro do solo**; **QF = qualidade do fuste**, sendo (1) Fuste Reto, cilindro e sadio, (2) Fuste com algum aproveitamento, (3) Fuste Tortuoso; **HT = altura total da árvore**, em metros; **HC = altura comercial da árvore**, em metros; **FF = fenofase**, sendo (FL) Floração, (FT) Frutificação, (TF) Troca de folhas, (FN) Folhas novas; **PS = posição sociológica**, sendo: (1) Emergente, (2) Dominante, (3) Co-dominante, (4) Dominada, (5) Sub-bosque

Nº	Latitude S (°)	Longitude W (°)	VA	CAP (cm)	QF	HT (m)	HC (m)	FF	PS
1	03.09012	59.96474	1	96	1	18	11	FN	2
2	03.10069	59.97549	1	50	1	14	8	FV	3
3	03.10073	59.97548	1	104	1	22	6	FN	2
4	03.10073	59.97548	1	60	1	16	8,5	FN	4
5	03.10068	59.97466	1	47	1	14	4	FN	4
6	03.10067	59.97458	1	50	1	13	7	FN	1
7	03.10067	59.97458	1	46	1	10	3	FN	4
8	03.10020	59.97173	1	76	1	14	3	FN	3
9	03.08876	59.96946	1	31	1	12	6	FN	4
10	03.08818	59.96926	1	36	1	10	7	FV	4
11	03.08816	59.96929	1	22	1	9,5	5	FV	4
12	03.08812	59.96919	1	20	1	8	3	FV	4
13	03.08839	59.96924	1	15	1	5	3	FV	4
14	03.08839	59.96925	1	18	1	4	7	FV	4
15	03.08843	59.96902	1	38	1	10	7,5	FV	3
16	03.08844	59.96900	1	21	1	11	7	FN	4
17	03.08333	59.96891	2	16	2	5	1	FV	4
18	03.10095	59.97531	2	15	2	7	2,5	FN	4
19	03.08679	59.96372	1	18	1	8	2	FN	4
20	03.08672	59.96376	1	31	1	15	8	FN	3
21	03.08648	59.96381	2	47	2	16	3,5	FV	3
22	03.08791	59.96562	2	45	2	12	5	FN	4
23	03.08795	59.96562	1	18	1	6	2,5	FN	4
24	03.08780	59.96523	2	65	2	13	4	FN	3
25	03.08852	59.96499	1	18	1	7	3	FN	4
26	03.08857	59.96510	1	18	1	7,5	3	FN	4
27	03.08853	59.96513	1	19	1	6,5	3	FN	4
28	03.08849	59.96517	2	15	2	3,5	2	FN	4
29	03.08795	59.96562	2	90	2	16	9,5	FN	2
30	03.08841	59.96530	1	65	1	16	11	FV	1
31	03.08827	59.96495	1	11	1	3,5	1	FT	4
32	03.09005	59.96468	2	18	2	6	2	FN	4
33	03.08969	59.9631	3	90	3	15	5	FN	2

Tabela 3 - Dados e informações dos indivíduos de *Eschweilera coriacea* (DC.) S. A. Mori coletados em Manaus-AM, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, no dia 02 de abril de 2009, onde: **VA = vitalidade das árvores**, sendo (1) árvore sadia e copa bem desenvolvida, (2) Árvore com aspecto doentio e copa medianamente desenvolvida, (3) Árvore atacada por insetos e fungos e copas defeituosa; **CAP = circunferência à altura de 1,30 metro do solo**; **QF = qualidade do fuste**, sendo (1) Fuste Reto, cilindro e sadio, (2) Fuste com algum aproveitamento, (3) Fuste Tortuoso; **HT = altura total da árvore**, em metros; **HC = altura comercial da árvore**, em metros; **FF = fenofase**, sendo (FL) Floração, (FT) Frutificação, (TF) Troca de folhas, (FN) Folhas novas, **PS = posição sociológica**, sendo: (1) Emergente, (2) Dominante, (3) Co-dominante, (4) Dominada, (5) Sub-bosque

Nº	Latitude S (°)	Longitude W (°)	VA	CAP (cm)	QF	HT (m)	HC (m)	FF	PS
1	02,5539	59,5831	1	90	2	18	9	FN	5
2	02,5539	59,5831	1	48	1	19	10	FN	3
3	02,5534	59,5833	1	131	1	25	20	FN	2
4	02,5534	59,5833	1	40	1	20	11	FN	2
5	02,5534	59,5832	1	95	2	20	12	FN	3
6	02,5534	59,5832	1	64	2	23	16	FN	3
7	02,5533	59,5832	1	60	2	23	15	FN	3
8	02,5533	59,5833	1	42	1	15	8	FN	3
9	02,5533	59,5832	1	74	1	26	17	FN	2
10	02,5535	59,5830	1	79	1	23	16	FN	2
11	02,5535	59,5830	1	75	1	20	9	FN	2
12	02,5535	59,5836	3	63	3	18	7	FN	3
13	02,5539	59,5833	1	45	1	18	9	FN	2
14	02,5539	59,58333	1	53	1	16	10	FN	2
15	02,5539	59,5833	1	7	2	20	13	FN	3
16	02,5539	59,5832	1	70	1	19	14	FN	2
17	02,5540	59,5832	1	45	1	16	12	FN	3
18	02,5549	59,5830	1	30	1	5	13	FN	4
19	02,5553	59,5831	1	10	1	10	5	FN	5
20	02,5553	59,5831	3	15	2	7	5	FN	4
21	02,5555	59,5820	1	30	2	16	4	FN	4
22	02,5555	59,5820	1	115	2	19	6	FN	2
23	02,5557	59,5818	1	35	3	12	8	FN	3
24	02,5557	59,5818	1	86	1	20	12	FN	2
25	02,5557	59,5817	1	36	1	10	3,5	FN	3
26	02,5558	59,5816	1	90	1	26	18	FN	1
27	02,5559	59,5815	1	45	1	22	15	FN	1
28	02,5559	59,5816	1	33	2	16	9	FN	4
29	02,5559	59,5816	1	75	1	25	19	FN	1
30	02,5559	59,5816	1	31	2	11	6	FN	4
31	02,5547	59,5829	1	67	1	23	18	FN	1
32	02,5559	59,5817	1	63	2	16	9	FN	2

Tabela 4. Dados e informações dos indivíduos de *Eschweilera coriacea* (DC.) S. A. Mori coletados em Coari-AM, no dia 03 de julho de 2009, onde: **VA = vitalidade das árvores**, sendo (1) árvore sadia e copa bem desenvolvida, (2) Árvore com aspecto doentio e copa medianamente desenvolvida, (3) Árvore atacada por insetos e fungos e copas defeituosa; **CAP = circunferência à altura de 1,30 metro do solo**; **QF = qualidade do fuste**, sendo (1) Fuste Reto, cilindro e sadio, (2) Fuste com algum aproveitamento, (3) Fuste tortuoso; **HT = altura total da árvore**, em metros; **HC = altura comercial da árvore**, em metros; **FF = fenofase**, sendo (FL) Floração, (FT) Frutificação, (TF) Troca de folhas, (FN) Folhas novas; **PS = posição sociológica**, sendo: (1) Emergente, (2) Dominante, (3) Co-dominante, (4) Dominada, (5) Sub-bosque

Nº	Latitude S (°)	Longitude W (°)	VA	CAP (cm)	QF	HT (m)	HC (m)	FF	PS
1	04,07315	63,04506	1	85	2	13	7	FV	3
2	04,07315	63,04483	1	75	1	14	6	FN	3
3	04,07352	63,04488	1	80	2	14	9	FV	2
4	04,07360	63,04487	1	52	1	12	7	FV	4
5	04,07396	63,04487	1	53	2	11	7	FV	4
6	04,07408	63,04484	1	33	1	10	6	FV	4
7	04,07406	63,04474	1	80	1	15	10	TF	3
8	04,07408	63,04478	1	105	2	16	12	FV	3
9	04,07425	63,04466	1	95	1	16,5	11	FN	3
10	04,07429	63,04468	1	75	3	15	12	FV	3
11	04,07446	63,04463	1	140	1	17	13	FN	2
12	04,07463	63,04456	1	90	1	16	11	FN	3
13	04,07470	63,04462	1	95	1	16	12	FV	3
14	04,07492	63,04460	1	94	1	16	10	FV	3
15	04,07495	63,04458	1	75	1	17	13	FN	3
16	04,07508	63,04453	1	88	2	17	13	FN	2
17	04,07519	63,04442	1	73	1	16	12	FN	3
18	04,07530	63,04422	1	92	1	16	12	FN	2
19	04,07545	63,04420	1	85	1	15	12	FN	3
20	04,07538	63,04413	1	130	2	17	13	FN	2
21	04,07543	63,04425	1	89	1	17	13	FV	3
22	04,07563	63,04450	1	75	2	16	12	FN	3
23	04,07595	63,04466	1	59	2	11	7	FN	4
24	04,07601	63,04475	1	78	2	15	11	FV	3
25	04,07614	63,04491	1	120	1	16	12	FV	3
26	04,07632	63,04474	1	86	2	14	10	FV	3
27	04,07664	63,04460	1	48	2	15	10	FV	3
28	04,07656	63,04449	1	85	2	15	11	FN	3
29	04,07664	63,04440	1	76	1	16	11	FN	3
30	04,07664	63,04463	1	120	1	18	14	FN	2
31	04,07672	63,04463	1	67	2	11	6	FV	4
32	04,07666	63,04440	1	70	1	8	4	FN	2
33	04,07667	63,04445	1	58	1	13	8	FV	4

Tabela 5 - Dados e informações dos indivíduos de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori coletados em Maués-AM, no dia 02 de abril de 2010, onde: **VA = vitalidade das árvores**, sendo (1) árvore sadia e copa bem desenvolvida, (2) Árvore com aspecto doentio e copa medianamente desenvolvida, (3) Árvore atacada por insetos e fungos e copas defeituosa; **CAP = circunferência à altura de 1,30 metro do solo**; **QF = qualidade do fuste**, sendo (1) Fuste Reto, cilindro e sadio, (2) Fuste com algum aproveitamento, (3) Fuste tortuoso; **HT = altura total da árvore**, em metros; **HC = altura comercial da árvore**, em metros; **FF = fenofase**, sendo (FL) Floração, (FT) Frutificação, (TF) Troca de folhas, (FN) Folhas novas; **PS = posição sociológica**, sendo: (1) Emergente, (2) Dominante, (3) Co-dominante, (4) Dominada, (5) Sub-bosque.

Nº	Latitude S (°)	Longitud e W (°)	VA	CAP (cm)	QF	HT (m)	HC (m)	FF	PS
1	03,27.225	57,38.970	2	63,5	3	14	8	FN	3
2	03,26.642	57,38.971	2	15,3	1	4	2	FN	5
3	03,26.644	57,38.976	1	80,8	1	20	8	FV	1
4	03,26.651	57,38.977	1	35,2	1	15	9	FV	1
5	03,26.659	57,38.988	1	66,3	1	20	8	FV	1
6	03,26.657	57,38.983	1	10,1	1	7	3	FV	4
7	03,26.667	57,38.995	1	70,3	1	18	10	FV	1
8	03,26.674	57,39.010	1	40,3	2	14	7	FV	2
9	03,26.661	57,38.991	2	35,2	1	16	13	FV	1
10	03,26.682	57,39.010	1	110	1	25	15	FV	1
11	03,26.661	57,39.010	2	10,1	1	6	3,5	FV	4
12	03,26.666	57,38.998	3	150	1	28	20	FV	1
13	03,26.690	57,39.007	2	50	3	8	5	TF	3
14	03,26.625	57,38.995	2	29	2	12	6	TF	2
15	03,26.631	57,39.061	1	35,1	1	15	7	FN	2
16	03,26.965	57,39.040	1	95,2	1	27,3	21	FV	1
17	03,26.949	57,39.050	1	10,2	1	8	4	FN	4
18	03,27.115	57,39.130	1	11,4	1	2,5	1	FN	4
19	03,27.153	57,39.147	1	95,1	3	19	9	FN	1
20	03,27.157	57,39.145	1	91,6	1	21	15	FN	1
21	03,27.167	57,39.146	1	120	2	21,2	19,1	FN	1
22	03,27.413	57,39.109	1	110,2	1	22,5	16,3	FN	1
23	03,27.419	57,39.100	1	125,6	1	24,1	15	FN	1
24	03,27.414	57,39.094	1	92,1	1	18,7	15,3	FN	1
25	03,27.410	57,39.083	1	73,2	1	21,5	17,2	FN	1
26	03,27.312	57,39.083	2	10,8	1	7	5	FV	4
27	03,24.094	57,45.175	1	15,9	1	6	3,5	FN	1
28	03,24.094	57,45.201	1	25,8	1	8	4	FV	4
29	03,24.117	57,45.243	2	35	1	15	7	FV	3
30	03,24.115	57,45.255	1	19	1	9	6	FV	3
31	03,24.110	57,45.255	1	22,4	2	8	2	FV	2
32	03,24.106	57,45.246	1	28,5	1	11	9	FN	2
33	03,24.100	57,45.231	1	23,2	2	13	8	FN	2
34	03,24.104	57,45.199	2	23,6	2	10	7	FN	2
35	03,24.114	57,45.076	1	28,1	1	9	6	FN	1

Tabela 6 - Dados e informações dos indivíduos de *Eschweilera coriacea* (DC.) S. A. Mori coletados em Parintins-AM, no período de 06 de abril a 09 de maio de 2010, onde: **VA** = **vitalidade das árvores**, sendo (1) árvore sadia e copa bem desenvolvida, (2) Árvore com aspecto doentio e copa medianamente desenvolvida, (3) Árvore atacada por insetos e fungos e copas defeituosa; **CAP** = **circunferência à altura de 1,30 metro do solo**; **QF** = **qualidade do fuste**, sendo (1) Fuste Reto, cilindro e sadio, (2) Fuste com algum aproveitamento, (3) Fuste tortuoso; **HT** = **altura total da árvore**, em metros; **HC** = **altura comercial da árvore**, em metros; **FF** = **fenofase**, sendo (FL) Floração, (FT) Frutificação, (TF) Troca de folhas, (FN) Folhas novas; **PS** = **posição sociológica**, sendo: (1) Emergente, (2) Dominante, (3) Co-dominante, (4) Dominada, (5) Sub-bosque

Nº	Latitude S (°)	Longitude W (°)	VA	CAP (cm)	QF	HT (m)	HC (m)	FF	PS
1	2,42693	56, 41504	1	14,3	1	7	5	FN	4
2	2,42966	56, 40894	1	17,9	2	8,5	5,5	FN	4
3	2,43189	56, 40561	1	13,1	1	7,5	6	FN	4
4	2,43174	56, 40550	1	135	1	28,1	20	FN	1
5	2,43173	56, 40552	1	35,5	1	10	8	FN	4
6	2,43177	56, 40531	2	46	1	12	7	FN	4
7	2,43159	56, 40519	1	55,1	1	12	8	FN	4
8	2,43128	56, 40493	1	39,7	1	11	9	FN	4
9	2,42553	56, 41099	1	43,2	1	7	2	FN	4
10	2,39244	56, 40028	1	25,7	1	6	3	FN	4
11	2,39430	56, 39754	1	23,5	1	5	2	FN	4
12	2,43170	56, 40592	1	19,6	1	4	1	FN	4
13	2,39430	56, 40675	1	16,3	1	5	4	FN	4
14	2,43403	56, 40677	1	60,1	1	12	3	FN	3
15	2,43408	56, 40648	1	15,4	1	6	3	FN	5
16	2,43422	56, 40646	1	65,3	1	25	12	FN	1
17	2,43422	56, 40655	1	22	1	11	7	FN	3
18	2,43426	56, 40667	1	24	1	15	6	FN	3
19	2,43444	56, 40678	1	33,5	1	11	6	FN	3
20	2,43496	56, 40738	1	33,4	1	11	9	FN	3
21	2,43494	56, 40766	1	22,4	1	11	7	FN	4
22	2,43502	56, 40775	1	47,6	1	15	6	FN	3
23	2,43500	56, 40737	1	53,9	1	17	11	FN	3
24	2,43415	56, 40648	1	15	1	5	3	FN	3
25	2,43263	56,40144	1	90,1	1	25	22	FN	1
26	2,43256	56, 40127	1	17,3	1	9	5	FN	1
27	2,43259	56, 40137	1	66,6	1	23	18	FN	1
28	2,43267	56, 40139	1	29,1	1	12	9	FN	1
29	2,43261	56, 40141	1	37,1	1	16	12	FN	1
30	2,43272	56, 40152	1	71,2	2	29	20	FN	1
31	2,43265	56, 40158	1	25,9	1	15	9	FN	1
32	2,43264	56, 40157	1	80,1	1	15	8	FN	3
33	2,43280	56, 40180	1	12,3	1	9	5	FN	4
34	2,43285	56, 40182	1	53,5	1	14	9	FN	3
35	2,42623	56, 41100	1	66,5	1	15	8	FN	3

ANEXO 3. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS COLETADOS

Em relação à distribuição diamétrica, 62 indivíduos (31%) encontraram-se distribuídos na primeira classe; 68 indivíduos (34%) na segunda classe e 47 indivíduos (24%) na terceira classe. Na última classe subsequente ficaram concentrados 22 indivíduos restantes (11%) (Tabela 1).

Tabela 1. Número de indivíduos por classe diamétrica em populações de *Eschweilera coriacea* (A.P. de Candolle) Mori. RO: Rondônia-BR-429/RO, UA: Fragmento Florestal da UFAM-Manaus/AM, RD: Reserva Adolpho Ducke-Manaus/AM, CO: Fazenda experimental da UFAM Coari/AM, MA: Município de Maués/AM, PA: Município de Parintins/AM.

Populações	Classes diamétricas (cm)				Total de Indivíduos por população
	< 9,9	10-19,9	20-29,9	30-69,9	
RO	8	18	3	2	31
UA	17	9	5	2	33
RD	0	17	12	3	32
CO	6	6	14	7	33
MA	15	6	7	7	35
PA	16	12	6	1	35

Dados semelhantes foram encontrados por Silva (2006) ao inventariar uma floresta de terra firme na Amazônia Ocidental, segundo o autor, dos 148 indivíduos de *E. coriacea* amostrados em três ha, 97 encontravam-se na classe diamétrica 5 a 19,9 cm e 32 indivíduos encontravam-se na classe de 20 a 29,9 cm e apenas 19 apresentavam-se em classes superiores a 30 cm. Tello *et al.* (2008) em levantamento florístico feito em 1,5 ha em fragmento florestal urbano de Manaus-AM, encontraram valores similares quanto à classe diamétrica do matamatá-amarelo.

A Figura 1 apresenta a altura total e comercial dos indivíduos de *E. coriacea* avaliados nas seis populações. As médias para altura total variaram de 9,9 m (população Rondônia-RO) a 18 m (população Reserva Ducke-RD). Para a variável altura comercial a população da UA (Universidade Federal do Amazonas/Manaus) apresentou a menor média (5 m) e a população da RD, apresentou a maior média (11,2 m).

Após a avaliação total das populações, observou-se que 57,3% dos indivíduos são

considerados de grande porte (altura acima de 10 metros), 26,1% possuem altura média (6,1 a 10 m) e 16,6% das árvores são consideradas de baixa estatura. Fato já observado por Salomão *et al.* (1995) no estudo sobre a estrutura diamétrica e caracterização ecológica econômica de 108 espécies arbóreas da Amazônia Brasileira, segundo os autores, dos 208 indivíduos de *E. coriacea* encontrados em 21 hectares, 70 % das árvores era de porte grande, possuindo em média 15,9 metros de altura.

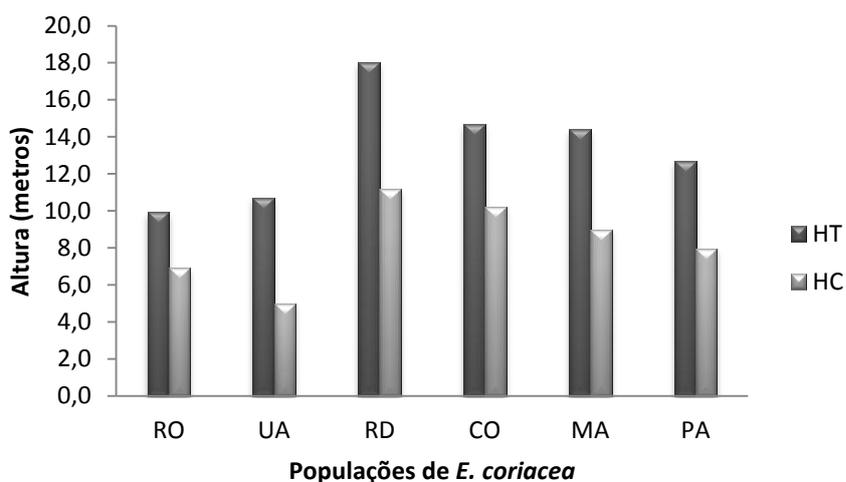


Figura 1. Altura média total (HT) e comercial (HC) de seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori .

Ao se avaliar o estrato superior e inferior dos indivíduos de *E. coriacea* (Figura 2) foi observado que a maioria dos indivíduos amostrados encontravam-se no estrato superior da floresta (74,4%) e apenas 25,6% encontravam-se no estrato inferior. Vale salientar, que as populações da Reserva Ducke, Coari e Rondônia possuem floresta mais estruturada, sendo as populações de Maués, Parintins e UFAM de dossel inferior da floresta.

Ressalta-se, que uma espécie determinada tem seu lugar assegurado na estrutura e composição da floresta quando se encontra representada em todos os seus estratos, caracterizados como posição sociológica regular. Espécies que se encontram apenas em um ou outro estrato indicam que a floresta não se desenvolverá até o clímax. Devem-se

excetuar as espécies que caracteristicamente não passam do estrato inferior. Ainda, quanto mais regular for a distribuição dos indivíduos de uma espécie na estrutura vertical de uma floresta, tanto maior será seu valor na posição sociológica.

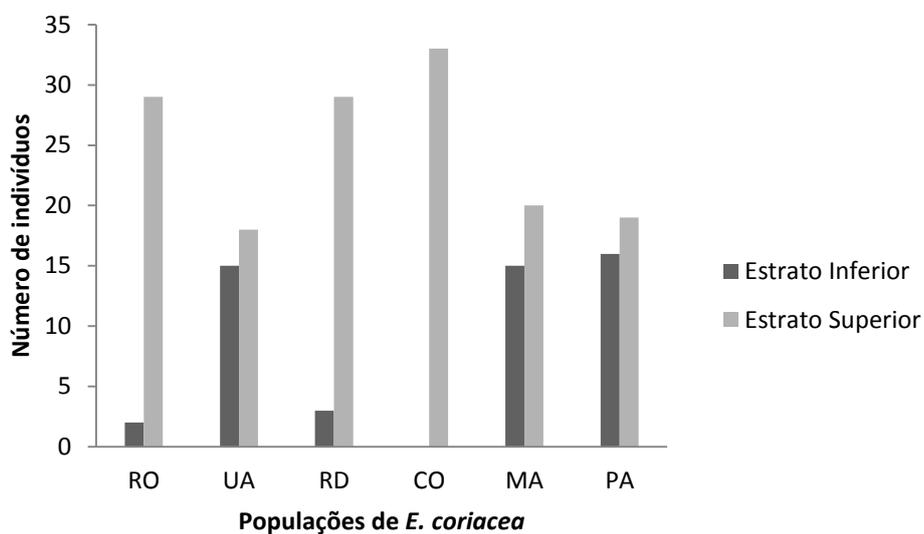


Figura 2. Estratificação vegetal das populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori

No parâmetro qualidade do fuste, do total de 199 árvores analisadas, 146 indivíduos de *E. coriacea* (73%) encontrados nas seis populações apresentaram fustes retos, cilíndricos e sadios, árvores com fustes com algum aproveitamento foram 43, perfazendo um total de 22% e 10 árvores (5%) apresentaram fuste tortuoso (Figura 3). Apesar do número variável de indivíduos, as populações de *E. coriacea*, apresentaram toras de excelente qualidade, que poderiam ser extraídas para a comercialização, devido a ótima qualidade do fuste.

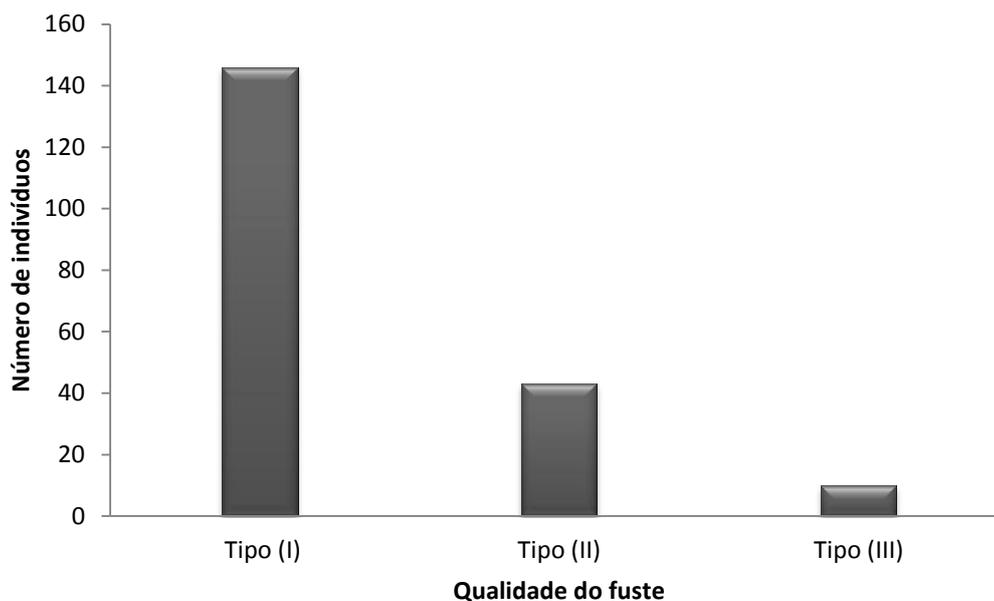


Figura 3. Qualidade do fuste dos indivíduos das seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori .

Quanto à vitalidade das árvores amostradas foram verificados em 170 árvores de *E.coriacea* (85%) a predominância de árvores consideradas como indivíduos sadios e copas bem desenvolvidas, com excelente fitossanidade, apresentando volumes proporcionais as dimensões do indivíduo amostrado, 21 (11%) foram árvores com aspecto doentio e copa medianamente desenvolvidas e 8 (4%) das árvores foram atacados por insetos e fungos e apresentaram copas defeituosas (Figura 4).

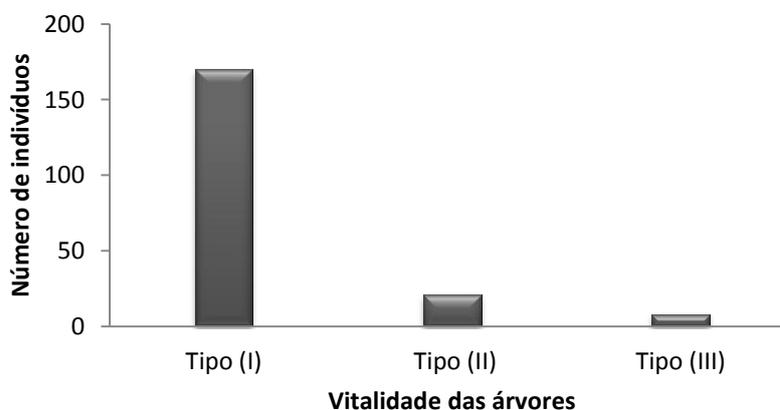


Figura 4. Vitalidade das árvores das seis populações de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori .

Os dados relacionados à posição sociológica dos indivíduos de *E. Coriacea* demonstraram que cerca de 35% são árvores com copa exposta a pleno sol do tipo emergentes dominantes, 29% são tipo co-dominantes, com copas expostas com menos de 50% luz de solar e 36% fazem parte do estrato inferior da floresta, isto é, não há incidência de luz solar plena (Figura 5).

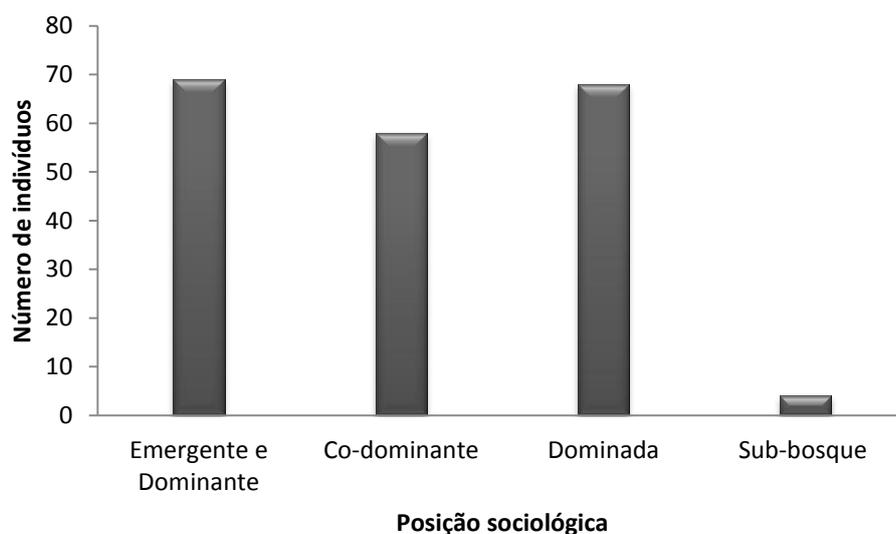


Figura 5. Posição sociológica das árvores de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori coletadas nas seis populações

As observações fenológicas realizadas nas seis populações estão apresentadas na figura 6. A fenofase dos indivíduos de *E. coriacea* indicaram que 68% das árvores apresentavam folhas novas, 26% folhas velhas, 5% estavam trocando suas folhas, um indivíduo proveniente da população de Rondônia (RO) apresentou floração e frutificação .

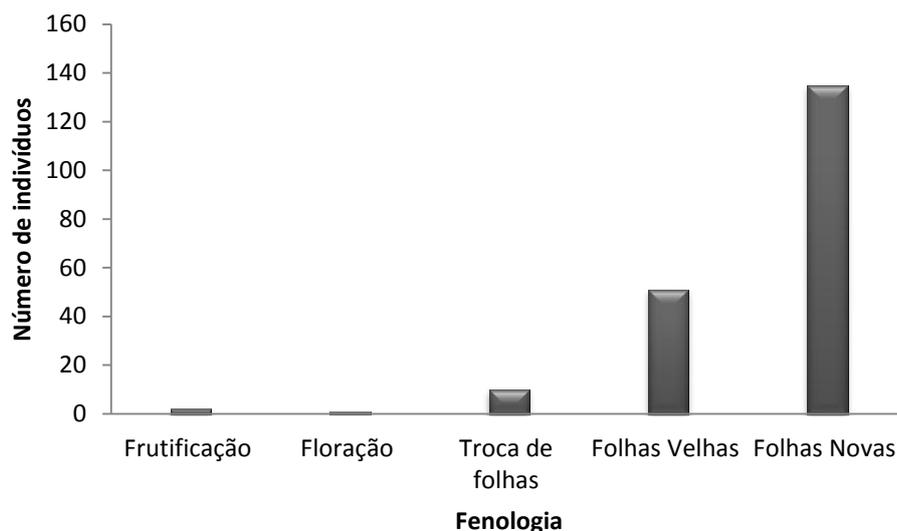


Figura 6 - Fenologia das árvores de *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A. Mori coletadas nas seis populações.

As características ambientais e os resultados dos parâmetros qualitativos apresentados acima demonstraram contínua evolução e adaptação sob a influência direta dos agentes ambientais energia solar, água e nutrientes. Árvores que apresentam fuste saudável e retilíneo fornecem madeira de boa qualidade para usos diversos (construção civil e naval) e árvores com fuste não retilíneo fornecem madeira para lenha e carvão.

De maneira geral, verificou-se que grandes alterações em diâmetro médio nas populações de *E. coriacea* estudadas podem estar relacionadas ao corte seletivo, explicando assim, a grande quantidade de árvores de pequeno porte observadas nas populações coletadas.