



CARLOS DELANO CARDOSO DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Dicypellium*
caryophyllaceum (Mart.) Ness NA ÁREA DE
INFLUÊNCIA DIRETA DA UHE BELO MONTE,
ALTAMIRA, PA**

**LAVRAS-MG
2016**

CARLOS DELANO CARDOSO DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Dicypellium caryophyllaceum* (Mart.)
Ness, NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DIRETA DA UHE BELO MONTE,
ALTAMIRA, PA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Dulcineia de Carvalho
Orientadora

**LAVRAS – MG
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Carlos Delano Cardoso de.

Diversidade genética de *Dicypellium caryophyllaceum* (Mart.)
Ness na Área de Influência Direta da UHE Belo Monte, Altamira,
PA / Carlos Delano Cardoso de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2016.
82 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Dulcineia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Conservação genética. 2. Marcador molecular. 3. Pau-cravo.
4. Espécie ameaçada de extinção. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CARLOS DELANO CARDOSO DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Dicypellium caryophyllaceum* (Mart.) Ness
NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DIRETA DA UHE BELO MONTE,
ALTAMIRA, PA
GENETIC DIVERSITY OF *Dicypellium caryophyllaceum* (Mart.) Ness AT
THE DIRECT INFLUENCE AREA OF BELO MONTE HYDROPOWER
PLANT, ALTAMIRA, PA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 14 de julho de 2016.

Dr. Fábio de Almeida Vieira	UFRN
Dr. Enéas Ricardo Konzen	UFLA
Dra. Josina Aparecida de Carvalho	UFLA

Profa. Dra. Dulcineia de Carvalho
Orientadora

**LAVRAS – MG
2016**

*A Deus por seu infinito amor.
Aos meus familiares Tadeu, Maria José,
Izabela e Bruna, por seu amor.
Às pessoas que não têm acesso à educação de qualidade.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e amor, por estar sempre comigo e iluminar meus caminhos.

Aos meus amados pais, Carlos Tadeu e Maria José, por seu puro amor, carinho, confiança e dedicação.

À minha amada irmã Izabela, por ser um grande exemplo em minha vida, por seus conselhos e, principalmente, por seu amor.

À minha amada Bruna, por seu amor, ternura, carinho, confiança, companheirismo, paciência, amizade e por me fazer me sentir especial, realizado e, imensamente, feliz.

À minha orientadora Dulcineia, por seus ensinamentos, sua imensa disponibilidade, apoio, dedicação, paciência, solicitude, confiança, por ser um exemplo de profissional e pela amizade cultivada.

Aos meus amigos pelo companheirismo, apoio, paciência e conselho.

Aos meus familiares, por compartilhar os momentos e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às pessoas que fizeram parte da minha vida e já partiram, pelos ensinamentos, momentos e por estarem sempre olhando por nós.

Aos funcionários, servidores, colegas de laboratório e demais pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa fosse concluída.

À Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza pelo financiamento do projeto, ao Engenheiro Florestal Lucas Guida Soares pela disponibilidade de coletar as amostras e à equipe da PAN Xingu Flora pelo acompanhamento nas coletas.

Ao Rafael de Paiva Salomão, pesquisador do Museu Paraense Emílio Goeldi, pela disponibilização de imagens e informações a respeito da espécie.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela oportunidade de realizar esta experiência,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO GERAL

A Usina Hidrelétrica Belo Monte é uma das maiores iniciativas do setor energético brasileiro. Sua instalação, na Bacia do Rio Xingu, traz uma série de consequências sociais, econômicas e ambientais. A ameaça à biodiversidade é um dos seus principais impactos negativos. O pau-cravo (*Dicypellium caryophyllaceum*, Lauraceae) é uma espécie arbórea que sofreu forte exploração, durante os séculos, por ser considerada uma especiaria e, atualmente, é bastante rara no território brasileiro. Portanto este estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética de uma população natural de *Dicypellium caryophyllaceum*, presente na Área de Influência Direta da Usina Hidrelétrica Belo Monte, em Altamira (Pará). A análise foi feita com base em 22 *primers* ISSR. No total, foram identificados 180 fragmentos, sendo 125 polimórficos (69,44%). O número de locos por *primer* variou de cinco a 15, com média 8,2 ($\pm 2,68$). O número de alelos (N_a) e número de alelos efetivos (N_e) foram, respectivamente, 1,672 e 1,470. A heterozigosidade esperada (H_e) e o Índice de Shannon (I) foram 0,266 e 0,389, respectivamente. A análise de estrutura genética espacial, realizada com base no coeficiente *kinship* de coancestria, foi significativa ($p < 0,05$) para distância de 21 m. O teste de Wilcoxon, para ocorrência de gargalo genético, apresentou resultado significativo ($P = 0,03125$), indicativo de que a população estudada passou por uma redução no tamanho populacional recentemente. Os resultados deste estudo mostraram que, apesar de se tratar de uma espécie endêmica e ameaçada, a população estudada de *D. caryophyllaceum* possui moderada diversidade genética. Os indivíduos distanciados entre si a menos de 21 m apresentam tendência de estruturação familiar e foi observado que a população passou por gargalo genético. A forte exploração da espécie, ocorrida nos últimos séculos, ocasionou sua redução populacional. A diminuição do tamanho populacional e o isolamento das populações podem levar à ocorrência de endogamia e deriva genética, o que reduz a diversidade genética e aumenta o risco de extinção.

Palavras-chave: Conservação genética. Marcador molecular. Pau-cravo.

GENERAL ABSTRACT

The Belo Monte Hydropower Plant is one of the largest initiatives of the Brazilian energy sector. Its installation in Xingu River Basin brings a range of social, economic and environmental consequences. One of the main negative impacts of its installation is threat to biodiversity. Brazilian clove bark (*Dicypellium caryophyllaceum*, Lauraceae) is an arboreal specie that suffered strong exploitation for centuries for being considered a spice and is currently quite rare in Brazil. Therefore, this study aimed at analyzing the genetic diversity of a natural population of *Dicypellium caryophyllaceum* present at the Direct Influence Area of Belo Monte Hydropower Plant in Altamira (Para). The analysis was based on 22 ISSR primers. A total of 180 fragments were identified, being 125 polymorphic (69,44%). The number of loci per primer ranged from five to 15, with mean of 8,2 ($\pm 2,68$). The number of alleles (N_a) and the number of effective alleles (N_e) were, respectively, 1,672 and 1,470. The expected heterozygosity (H_e) and Shannon index (I) were 0,266 and 0,389 respectively. Spatial genetic structure analysis based on coancestry kinship coefficient was significant ($p < 0,05$) for a distance of 21 m. The Wilcoxon test for the occurrence of genetic bottleneck showed a significant result ($P = 0,03125$), indicating that the studied population has recently experienced a reduction in population size. The results of this work showed that although it is an endemic and endangered species, the *D. caryophyllaceum* population has moderate genetic diversity. Individuals distant from less than 21 m exhibited a trend of family structure and it was observed the population underwent a genetic bottleneck. The strong exploitation of the species occurred in recent centuries leading to the reduction in its population size. Reduction in population size and isolation of populations may lead to inbreeding and genetic drift, which reduce the genetic diversity and increase its risk to extinction.

Keywords: Genetic conservation. Molecular marker. Brazilian clove bark.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1	Usinas hidrelétricas.....	3
2.1.1	Usina Hidrelétrica Belo Monte (UHBM).....	5
2.2	Conservação da biodiversidade	8
2.2.1	Espécies raras e espécies ameaçadas de extinção.....	9
2.3	Conservação genética.....	12
2.3.1	Diversidade genética.....	13
2.3.2	Estrutura genética espacial.....	16
2.3.3	Tamanho efetivo populacional, deriva genética e endogamia.....	17
2.3.4	Gargalo genético.....	20
2.3.5	Marcadores moleculares e marcadores ISSR.....	21
2.4	<i>Dicypellium caryophyllaceum</i> (Mart.) Ness.....	23
3.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	27
	REFERÊNCIAS.....	29
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO.....	37
	ARTIGO – Diversidade genética de <i>Dicypellium caryophyllaceum</i> na Área de Influência Direta da Usina Hidrelétrica Belo Monte ...	37
1.	INTRODUÇÃO	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	Área de estudo	43
2.2	Espécie estudada	44
2.3	Amostragem.....	46
2.4	Extração do DNA genômico e amplificação	47
2.5	Análise dos dados	49
2.5.1	Diversidade genética.....	49
2.5.2	Análise de agrupamento dos indivíduos.....	50
2.5.3	Estrutura genética espacial.....	50
2.5.4	Gargalo genético.....	51
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1	Diversidade genética	57
3.2	Análise de agrupamento dos indivíduos	59
3.3	Estrutura genética espacial.....	62
3.4	Gargalo genético	63
3.5	Considerações para conservação genética.....	64
4.	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico e o desenvolvimento industrial no Brasil trouxeram consigo aumento na demanda por energia elétrica. Assim, novos investimentos se tornaram necessários para suprir a demanda e garantir a segurança energética no país.

O Brasil possui uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo e as usinas hidrelétricas respondem por, aproximadamente, 65% da oferta energética interna (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE, 2015). Essa grande representatividade ocorre, principalmente, pela grande disponibilidade hídrica e condições favoráveis de relevo.

A Bacia Amazônica detém, aproximadamente, metade do potencial hidrelétrico brasileiro, sendo o Rio Xingu um dos seus rios mais importantes. A Bacia do Xingu é extremamente relevante para o patrimônio cultural e natural brasileiro. Essa região é considerada um complexo histórico e etnográfico, além de possuir elevada diversidade biológica (BERCHIN et al., 2015).

A Usina Hidrelétrica Belo Monte (UHE Belo Monte) é uma das maiores iniciativas brasileiras dos últimos tempos no setor energético. Belo Monte é o terceiro maior complexo hidrelétrico do mundo, atrás apenas de Itaipu, no Brasil e Paraguai, e Três Gargantas, na China (LESSA et al., 2015).

Apesar dos benefícios gerados com a instalação de usinas hidrelétricas (aumento na oferta energética, geração de empregos, melhorias em infraestrutura, entre outros), vários impactos socioambientais negativos, também, são gerados. A perda de biodiversidade pela construção de barragens e reservatórios é um exemplo dos impactos ambientais negativos.

A biodiversidade diz respeito à variedade de organismos em níveis de genes, espécies e ecossistemas (MCNEELY et al., 1990). As pressões antrópicas

têm causado perdas significativas na biodiversidade e muitas espécies estão ameaçadas de extinção. Para evitar o desaparecimento da biodiversidade, são necessários estudos que subsidiem a tomada de decisões para conservação *in situ* e *ex situ*, como aqueles destinados à conservação genética.

Um dos objetivos da conservação genética é o estudo da diversidade genética e sua distribuição no espaço (estrutura genética). A diversidade genética é fundamental para os seres vivos, pois é base para evolução e, portanto, essencial para resposta das espécies às mudanças ambientais bióticas e abióticas.

Em espécies com reduzido tamanho populacional efetivo (N_e), como as espécies ameaçadas de extinção, a diversidade genética é fortemente comprometida. Isso ocorre, porque pequenas populações estão mais sujeitas à deriva genética e endogamia. Assim, o conhecimento da diversidade genética é fundamental para conservar, efetivamente, essas espécies e evitar seu desaparecimento.

Dicypellium caryophyllaceum, vulgarmente conhecida como pau-cravo e canela-cravo, é uma espécie arbórea pertencente à família Lauraceae cuja ocorrência, no Brasil, foi relatada nos estados do Pará e Maranhão. No período colonial brasileiro, teve início a forte exploração do pau-cravo, principalmente, por suas características aromáticas. Essa exploração se manteve, durante os três séculos seguintes, o que tornou a espécie extremamente rara no território brasileiro e ameaçada de extinção (SALOMÃO; ROSA, 2012).

Assim, este estudo teve como principal objetivo analisar a diversidade genética de indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum* (Mart.) Ness (Lauraceae), existentes na Área de Influência Direta da Usina Hidrelétrica Belo Monte em Altamira, Pará. A partir deste estudo, buscou-se, também, (i) analisar a ocorrência de estrutura genética espacial (EGE) e (ii) verificar a ocorrência de gargalo genético na população estudada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Usinas hidrelétricas

Atualmente, as hidrelétricas são as maiores fontes de energia renovável do mundo, respondendo por 16% da oferta mundial. Essa forma de geração de energia tem sido usada em cerca de 160 países e China, Brasil, Canadá e Estados Unidos respondem juntos por metade da geração hidrelétrica mundial. Esses países, somados à Rússia, Noruega, Índia, Venezuela, ao Japão e à França, são responsáveis por 70% da geração total mundial (LESSA et al., 2015).

A matriz energética brasileira está entre as mais limpas do mundo, 74,6% da oferta interna de energia provêm de fontes renováveis. As usinas hidrelétricas são as maiores fontes de energia do Brasil, respondendo por 65,2% da oferta interna (BERCHIN et al., 2015; EPE, 2015; SANTOS et al., 2012).

No Brasil, estima-se que a produção energética a partir das hidrelétricas aumentará em torno de 30% até 2020. Esse desenvolvimento ocorrerá em virtude, principalmente, da expansão das iniciativas na região Norte do país, como no complexo do rio Tapajós e na hidrelétrica de Belo Monte (LESSA et al., 2015).

As usinas hidrelétricas são fontes renováveis de energia que se mostram soluções, para países como o Brasil, com características favoráveis (relevo e disponibilidade hídrica), para diminuição no consumo de combustíveis fósseis (BERCHIN et al., 2015; LOPES, S. et al., 2014). Seu funcionamento se baseia na construção de uma barragem para o represamento da água que é utilizada na alimentação de uma ou mais turbinas, que, por sua vez, movem um gerador que produz energia elétrica (ELETROBRÁS; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2009).

A geração de energia por hidrelétricas apresenta vantagens como menores custos comparados às termelétricas e à maioria das fontes renováveis, fornecimento de energia em escala com maior estabilidade que fontes eólicas e solares e, potencialmente, capacidade de gerar energia com menor emissão de gases do efeito estufa que as termelétricas, embora essas emissões, ainda, sejam consideráveis (LESSA et al., 2015; STICKLER et al., 2013).

Como as demais fontes de energia elétrica, as fontes hidrelétricas, também, apresentam impactos sociais e ambientais negativos. No que diz respeito aos impactos sociais, o estabelecimento das barragens e as inundações podem afetar, negativamente, a vida dos moradores locais incluindo seu deslocamento forçado, destruição de áreas comunitárias e ancestrais, facilitação da disseminação de doenças e aumento do desemprego ao término da construção das barragens (STICKLER et al., 2013). Em relação aos impactos ambientais, a construção de barragens e reservatórios impõe mudanças significativas ao comportamento hídrico, destruição de habitats, fragmentação dos ecossistemas, isolamento da fauna e flora, entre outros (LOPES, S. et al., 2014).

A dinâmica ecológica e o funcionamento dos reservatórios estão relacionados às características da bacia hidrográfica, fatores atuantes (ciclos ecológicos, hidrológicos e climatológicos) e às ações antrópicas nessas áreas (TUNDISI; MATSUMARA-TUNDISI; TUNDISI, 2015). A construção de barragens altera o comportamento natural dos rios transformando os trechos a montante em ambientes lênticos e os trechos a jusante em ambientes lóticos. Essa ação gera uma série de mudanças nas características da água e dos ecossistemas afetados (BERCHIN et al., 2015; SOUSA JUNIOR; REID, 2010).

A construção de barragens, para represamento de água e geração de energia elétrica, foi realizada, em muitas regiões do Brasil, sem o entendimento necessário das consequências ambientais (LOPES, S. et al., 2014). Contudo as discussões a respeito dos impactos gerados pelas usinas hidrelétricas se

intensificaram nos últimos tempos (LESSA et al., 2015; LOPES, S. et al., 2014; SANTOS et al., 2012).

2.1.1 Usina Hidrelétrica Belo Monte (UHEBM)

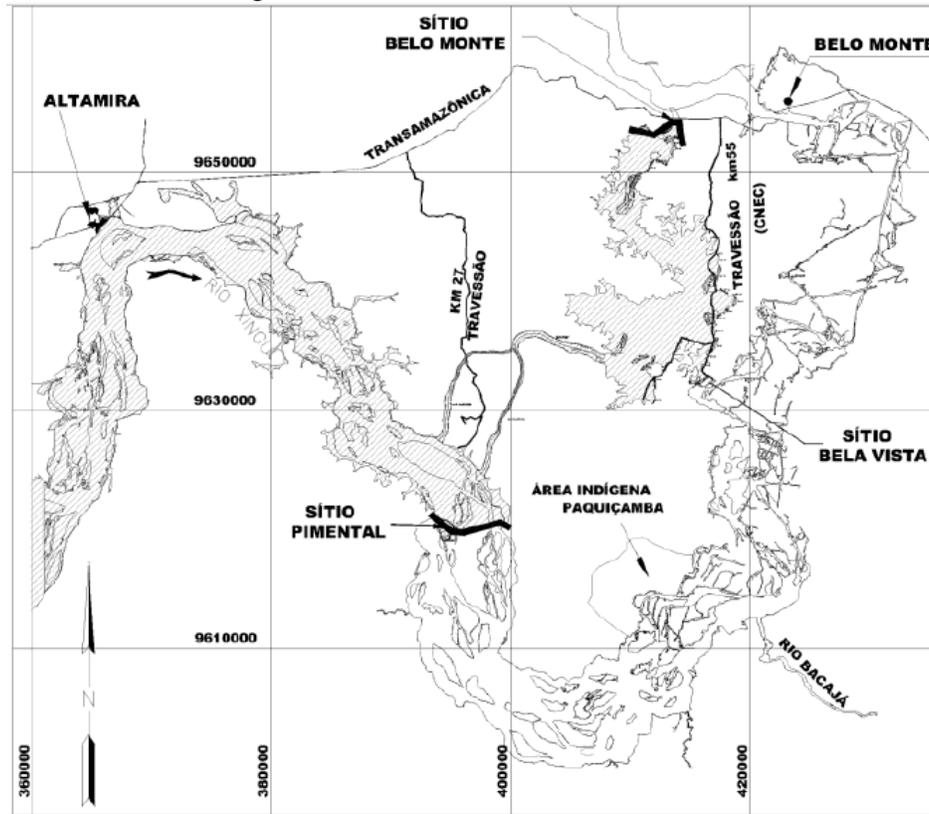
As regiões Sul e Sudeste já possuem seu potencial hidrelétrico bastante explorado e baixas perspectivas para novos investimentos. Assim, a região Norte e, conseqüentemente, a Amazônia brasileira têm atraído crescentes investimentos hidrelétricos pelo seu grande potencial e pela demanda por energia (LESSA et al., 2015; SOUSA JUNIOR; REID, 2010).

A crise do petróleo, ocorrida na década de 1970, motivou o governo ditatorial brasileiro a buscar a diversificação da matriz energética nacional para garantir a segurança energética. A partir daí, a Bacia do Rio Xingu foi mapeada por um grupo de engenheiros (Consórcio Nacional de Engenheiros Consultores S.A.) que apresentou propostas para construção de cinco hidrelétricas nessa bacia (BERCHIN et al., 2015).

A Usina Hidrelétrica Belo Monte (UHEBM) está localizada em um trecho do rio Xingu (Pará) denominado Volta Grande. Trata-se de um trecho de corredeiras próximo ao município de Altamira que recebe esse nome em razão de uma mudança abrupta que o rio faz em sua trajetória no sentido ao Norte da Amazônia. O projeto envolve três localidades: sítio Belo Monte, localizado na interseção do Rio Xingu com a rodovia Transamazônica; sítio Pimental, situado nos municípios de Vitória do Xingu e Altamira; e sítio Bela Vista, localizado entre os sítios Belo Monte e Pimental (SOUSA JUNIOR; REID, 2010).

A Figura 1 mostra a Usina Hidrelétrica Belo Monte e suas áreas adjacentes: a água do rio Xingu é desviada pela barragem Pimental e é transferida lateralmente até a barragem de Belo Monte onde, após a geração da energia, retorna ao rio (SOUSA JUNIOR; REID, 2010).

Figura 1 – Usina Hidrelétrica Belo Monte.



Fonte: Sousa Júnior e Reid (2010).

A Usina Hidrelétrica Belo Monte, no estado Pará, é o maior plano hidrelétrico do Brasil nos últimos 10 anos (TUNDISI; MATSUMARA-TUNDISI; TUNDISI, 2015). Sua capacidade hidrelétrica é de 11.233,1 MW o que torna Belo Monte uma das maiores hidrelétricas do mundo, atrás apenas das hidrelétricas Três Gargantas (China) e Itaipu binacional (Brasil e Paraguai), que possuem capacidades de geração de 22.500 MW e 14.000 MW, respectivamente (BERCHIN et al., 2015; ELETROBRÁS; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2009; SANTOS et al., 2012; STICKLER et al., 2013).

Em fevereiro de 2016, foi finalizado o enchimento dos reservatórios e teve início o funcionamento de uma turbina em fase de teste (CRAIDE, 2016). Atualmente, a Usina Hidrelétrica de Belo Monte já funciona comercialmente e a previsão é de que o pleno funcionamento seja alcançado em 2019 (AGÊNCIA BRASIL, 2016; BRASIL, 2016).

O processo de geração energética, em Belo Monte, produzirá, aproximadamente, 40% da energia estimada pelas condições sazonais de pluviosidade. A geração média anual esperada é de 4.500 MW e a capacidade máxima (11.233 MW) é esperada apenas nos períodos mais chuvosos (BERCHIN et al., 2015). Apesar do rendimento limitado, a usina Belo Monte apresenta relação área/capacidade de 0,05 km²/MW, valor inferior à média nacional (0,49 km²/MW) e de outras usinas brasileiras como Serra da Mesa (1,40 km²/MW), Tucuruí (0,29 km²/MW) e Itaipu (0,10 km²/MW) (SANTOS et al., 2012; SOUSA JUNIOR; REID, 2010).

Originalmente, o mecanismo, para aumentar a produção energética de Belo Monte, na época de seca, consistiria na criação de várias barragens e reservatórios grandes acima do reservatório principal. Contudo uma alteração foi feita de forma a desviar parte do rio para um canal que deságua em uma cascata natural de, aproximadamente, 90 metros. Apesar de inundar uma área florestal e da não regulação da sazonalidade, essa alternativa reduz o tamanho do reservatório de 1.225 km² para 516 km² porque não será mais necessária a carga hidráulica de um reservatório artificial profundo (BERCHIN et al., 2015; ELETROBRÁS; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2009; STICKLER et al., 2013).

A instalação da UHBM causa impactos positivos e negativos na região e no país. Seus principais impactos positivos são: aumento no fornecimento de energia; a forma de operação diminuirá os impactos socioambientais na região; armazenamento de água em outras hidrelétricas para produção de energia no

período de seca; criação de empregos. Já os principais impactos negativos são: desalojamento de moradores; interferência na vida social e relações histórico-culturais; alterações em seus modos de produção e consumo; crescimento populacional; alterações da paisagem; perda de biodiversidade (BERCHIN et al., 2015; ELETROBRÁS; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2009).

A construção da barragem causa grande impacto na biodiversidade uma vez que a continuidade dos ambientes ripários é interrompida. Isso pode levar à restrição do fluxo gênico de plantas e animais, deteriorando a diversidade funcional e genética ao longo do tempo e expondo as populações às drásticas mudanças no ambiente (LOPES, S. et al., 2014).

2.2 Conservação da biodiversidade

De acordo com McNeely et al. (1990), biodiversidade é a variação e a variabilidade de organismos vivos e processos ecológicos dos quais eles fazem parte. Segundo esses autores, a biodiversidade ocorre em três níveis: (i) diversidade genética, que consiste na informação genética total contida em todos os seres vivos que habitam a Terra; (ii) diversidade específica, que se refere à variedade de organismos vivos na Terra e; (iii) diversidade ecossistêmica, que diz respeito à variedade de habitats, comunidades bióticas e processos ecológicos presentes na biosfera.

As ações humanas afetam direta e indiretamente a biodiversidade. As consequências da destruição de habitats, na viabilidade de populações, são relevantes, para os estudos em conservação e, conseqüentemente, para manutenção da biodiversidade. Um grande e desconhecido número de espécies já foram extintas e outras tiveram suas populações tão reduzidas que se encontram em risco de extinção (FRANKHAM, 2003).

Conservação é o manejo no uso humano da biosfera de forma a beneficiar as gerações presentes e manter o potencial para o as necessidades e desejos das futuras gerações. A conservação dos recursos naturais, portanto consiste no manejo sustentável desses recursos (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE - IUCN; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - UNEP; WORLD WILDLIFE FUND - WWF, 1980).

A conservação pode ser realizada de duas maneiras: *in situ* e *ex situ*. Conservação *in situ* diz respeito às ações realizadas *in loco*, isto é, nos locais de ocorrência natural da(s) espécie(s) alvo. As Unidades de Conservação são os principais mecanismos para conservação *in situ*. A conservação *ex situ*, por sua vez, é aquela realizada em locais diferentes ao local de ocorrência natural da espécie. A criação de jardins botânicos, bancos de germoplasma, zoológicos, programas de reprodução em cativeiro, entre outros, são exemplos de ações de conservação *ex situ* (IUCN; UNEP; WWF, 1980).

Para conservação e sustentabilidade de populações, no ambiente, ao longo do tempo, é fundamental identificar se as populações mantêm um conjunto de características genéticas distintas (ÁLVARES-CARVALHO et al., 2015; HU et al., 2014). A conservação da diversidade genética é um dos principais objetivos da biologia da conservação uma vez que essa variação é a base para evolução e, portanto, para o processo de adaptação às mudanças no ambiente (AGUIAR et al., 2008; WU et al., 2015).

2.2.1 Espécies raras e espécies ameaçadas de extinção

Ultimamente, a preservação de espécies selvagens tem sido uma das maiores preocupações da biologia da conservação. As taxas de extinção dessas

espécies vêm aumentando, significativamente, em resposta às ações humanas (SHAH et al., 2008).

Em decorrência de perturbações naturais ou antrópicas, muitas espécies podem sofrer drástica redução populacional. Em casos extremos, poucos ou um único indivíduo podem restar em toda área de ocorrência da espécie (FRANKHAM, 2003; LI et al., 2012).

Espécies naturalmente raras são aquelas que possuem distribuição geográfica restrita, restrita especificidade de habitat, reduzida dispersão de pólen e sementes, baixa taxa reprodutiva ou reduzido tamanho populacional local. Essas espécies possuem diferentes tamanhos populacionais, estruturas genéticas e distribuição geográfica (VINSON et al., 2015). Segundo Karron (1991), as espécies raras podem ser divididas em três grupos: espécies amplamente distribuídas com baixa densidade em nível local, espécies que apresentam alta especificidade de habitat e espécies endêmicas distribuídas entre uma e cinco populações.

Normalmente, espécies raras são geneticamente menos diversas que aquelas amplamente distribuídas ou comuns (AGUILAR et al., 2008; SHAH et al., 2008; VINSON et al., 2015). Em razão, também, de aspectos demográficos e ameaças ambientais, essas espécies apresentam maior risco de extinção estocástica. Dessa forma, espécies raras necessitam de rápida intervenção para sua sobrevivência (FRANKHAM, 2003; VINSON et al., 2015).

As espécies ameaçadas de extinção são aquelas com alto risco de desaparecimento na natureza em futuro próximo, assim reconhecidas pelo Ministério do Meio Ambiente, com base em documentação científica disponível (BRASIL, 2008). Comumente, a maioria das espécies ameaçadas de extinção apresenta sucesso reprodutivo reduzido. Isso é uma consequência da depressão por endogamia e do seu reduzido potencial evolutivo (FRANKHAM, 2003). São exemplos de espécies ameaçadas de extinção: pinheiro-brasileiro (*Araucaria*

angustifolia, Araucariaceae), Jussara (*Euterpe edulis*, Arecaceae), pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Fabaceae), pau-cravo (*Dicypellium caryophyllaceum*, Lauraceae), entre outras (BRASIL, 2008).

A conservação de espécies ameaçadas de extinção se tornou uma preocupação global por seus valores ecológicos, educacionais, históricos, estéticos, recreacionais e científicos (ZHOU et al., 2014). Segundo Frankham (2005), a extinção biológica ocorre pela combinação dos efeitos de fatores determinísticos (destruição de habitat, exploração excessiva, introdução de espécies e poluição) e estocásticos (demográficos, ambientais, genéticos e catastróficos).

Geralmente, grande parte das espécies ameaçadas se encontra dividida em grupos de indivíduos que reproduzem entre si, seja em diferentes fragmentos de habitats, unidades de conservação ou coleções e criadouros. Dessa forma, a caracterização e gestão da diversidade genética dessas espécies devem ser feitas considerando-se as estruturas populacionais idiossincráticas (TORO; CABALLERO, 2005).

Para espécies raras e ameaçadas de extinção, o conhecimento da diversidade genética e sua distribuição nas populações é extremamente relevante na determinação de estratégias eficientes para conservação (SHAH et al., 2008; WU et al., 2015). Muitas espécies de plantas estão ameaçadas de extinção pela destruição de habitat. Para que a proteção dessas espécies seja efetiva, é necessário conhecimento da diversidade genética e sua distribuição dentro e entre populações, além do entendimento das causas da raridade (CI et al., 2008; ZHOU et al., 2014).

Aspectos fundamentais para biologia da conservação como a perda da diversidade genética em programas de conservação e a restauração de populações ameaçadas só podem ser considerados a partir de detalhados estudos em conservação genética (HU et al., 2014; ZHOU et al., 2014).

2.3 Conservação genética

A perda de características genéticas dos recursos florísticos e faunísticos é uma das maiores consequências da pressão antrópica sobre os recursos naturais. Essa pressão coloca em risco parte da biodiversidade existente, no planeta, o que tornou necessário o desenvolvimento de estudos que subsidiassem técnicas e práticas que possibilitassem a reversão dessa situação (AGUIAR et al., 2013).

Os estudos genéticos adquirem papel cada vez mais importante na conservação da biodiversidade. A quantificação da distribuição da variação genética, estruturação genética espacial dos genótipos, fluxo gênico e taxas de cruzamentos são informações que contribuem fortemente para o bom planejamento e manejo da biodiversidade (HU et al., 2014; MELO JÚNIOR et al., 2015).

A conservação genética tem como objetivo estudar as informações genéticas dos seres vivos e, a partir delas, auxiliar na determinação das melhores estratégias para conservação, preservação e restauração de suas populações (GONÇALVES et al., 2014; LOPES, M. et al., 2014). De forma geral, as informações genéticas dizem respeito às sequências de DNA, genes individuais, cromossomos ou variação genética quantitativa (TORO; CABALLERO, 2005). A obtenção das informações a respeito dos níveis de diversidade genética ocorrentes nas populações naturais contribui para o entendimento da ecologia da espécie bem como a distribuição da diversidade genética no espaço (ÁLVARES-CARVALHO et al., 2015).

Segundo Frankham (2003), a conservação genética lida com fatores genéticos que afetam o risco de extinção bem como de práticas de manejo genético que reduzam esse risco. De acordo com esse autor, as principais

questões genéticas são: efeitos deletérios da endogamia na reprodução e sobrevivência (depressão por endogamia); perda de diversidade genética e capacidade de evolução em resposta às mudanças ambientais; fragmentação de populações e redução do fluxo gênico; deriva genética como principal processo evolucionário (superando a seleção natural); acumulação e perda de mutações deletérias; adaptação genética ao cativeiro e seus efeitos adversos no sucesso da reintrodução; resolução de incertezas taxonômicas; definição de unidades de manejo; uso de análises genéticas moleculares na análise forense; entendimento de aspectos da biologia da espécie importantes para conservação e efeitos deletérios no sucesso decorrentes de cruzamentos (depressão exogâmica).

2.3.1 Diversidade genética

As plantas apresentam um conjunto de genes capazes de codificar a produção de aminoácidos que, por sua vez, são usados na síntese de proteínas. Esses genes são divididos em duas classes: monomórficos e polimórficos. Os genes monomórficos são aqueles que apresentam um alelo por loco (frequência do alelo mais comum $\geq 99\%$) e estão presentes em todos os indivíduos de todas as populações de uma dada espécie. Os genes polimórficos são aqueles genes que apresentam mais de um alelo por loco e variam entre indivíduos de uma população, entre populações e entre espécies. As proporções de genes monomórficos e polimórficos variam de acordo com os grupos taxonômicos, sendo que em plantas a proporção média é de 50% (FALK; KNAPP; GUERRANT, 2001). Os genes polimórficos têm sido amplamente estudados uma vez que eles correspondem às regiões do DNA onde a variabilidade genética se manifesta.

Segundo Toro e Caballero (2005), a diversidade genética é definida como a variedade de alelos e genótipos presentes em uma população. Essa

variação tem como reflexos diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre indivíduos e populações.

De acordo com Hedrick (2001), a diversidade genética pode ser dividida em neutra, deletéria e adaptativa. A variação neutra é aquela que não apresenta efeitos (positivos ou negativos) em populações pelo baixo efeito do(s) coeficiente(s) seletivo(s) em relação ao tamanho efetivo populacional. A variação deletéria, por sua vez, é aquela que ocasiona efeitos negativos no *fitness*, muitas vezes, por mutações ou aumento na deriva genética. A variação adaptativa está relacionada às vantagens no *fitness* consequentes do surgimento de novas variantes ou por aquelas mantidas pelo equilíbrio de seleção. Conforme afirmam Toro e Caballero (2005), geralmente, as variantes neutras são usadas em abordagens conservacionistas, enquanto as variantes deletérias e adaptativas são relevantes nos contextos de sobrevivência e características economicamente importantes.

A diversidade genética é a matéria-prima para a evolução, uma vez que permite a adaptação das espécies às condições adversas (HU et al., 2014; LOPES, M. et al., 2014; WU et al., 2015; ZHOU et al., 2014). Essa variação tem origem pelo processo da mutação e é moldada a partir do fluxo gênico, recombinação, deriva genética aleatória e seleção natural (FRANKHAM, 2003).

Shah et al. (2008) ressaltam que a diversidade genética é um componente fundamental da biodiversidade, sendo fortemente relacionada à distribuição geográfica dos genótipos que constituem as subespécies, raças e ecotipos. Portanto, ela contribui não apenas com o sucesso das populações, mas também com o funcionamento e a resiliência dos ecossistemas (THOMAS et al., 2014).

A diversidade genética em populações está fortemente relacionada à resposta aos estresses ambientais em curto prazo e para mudança evolutiva em longo prazo (LIU et al., 2013; SHAH et al., 2008). Sua manutenção é

fundamental, pois permite às espécies responderem às mudanças ambientais, tanto bióticas quanto abióticas (CI et al., 2008; DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015; ELLSTRAND; ELAM, 1993; FRANKHAM, 2003; TORO; CABALLERO, 2005). A baixa diversidade genética tem como consequências o baixo tamanho populacional efetivo, a elevada depressão por endogamia, maior sensibilidade ao ataque de pragas e doenças e a redução do potencial evolutivo adaptativo da população (FRANKHAM, 2003; VINSON et al., 2015).

Geralmente, espécies arbóreas apresentam elevada diversidade genética. Isso ocorre como resultado da interação de fatores como elevada taxa de cruzamento e sistemas reprodutivos que envolvem sofisticados mecanismos de autoincompatibilidade e polinização zoocórica (DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015; KAGEYAMA et al., 2003; WARD et al., 2005).

A diversidade genética é medida, normalmente, pelas frequências de alelos e genótipos, proporção de locos polimórficos, heterozigosidade observada e esperada e diversidade alélica (TORO; CABALLERO, 2005). Seu monitoramento deve fazer parte de um contexto biológico significativo de forma que os efeitos de suas prováveis alterações sejam conhecidos. Para isso, é essencial a combinação de indicadores ecológicos e genéticos (THOMAS et al., 2014).

A frequência de monitoramento da diversidade genética deve ser determinada com base em aspectos práticos como recursos humanos, financeiros e número de espécies de interesse. A análise periódica da diversidade genética, associada a estudos de dinâmica florestal, em parcelas permanentes, pode contribuir, significativamente, para conservação. Assim, perdas na diversidade genética podem ser rapidamente identificadas e medidas podem ser tomadas (ELLSTRAND; ELAM, 1993).

2.3.2 Estrutura genética espacial

A estrutura genética espacial (EGE) em populações naturais diz respeito à distribuição não aleatória dos genótipos. Essa característica é resultado da ação de diferentes processos, como eventos históricos e pressão de seleção (VEKEMANS; HARDY, 2004).

O estudo da estrutura genética espacial dentro das populações (pequena escala espacial) possibilita a identificação de grupos de indivíduos aparentados através da detecção dos genótipos ou frequências genéticas (MELO JÚNIOR et al., 2015; MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2005). Nessa escala, a estruturação dos genótipos ocorre, provavelmente, pela limitada dispersão de alelos. Assim, a similaridade genética é maior entre indivíduos geograficamente próximos que entre indivíduos mais distantes, o que comprova a teoria do isolamento por distância (VEKEMANS; HARDY, 2004).

A autocorrelação espacial, com base em relações de parentesco, é um método bastante eficiente na caracterização da estrutura genética espacial. O coeficiente *kinship* é dos mais utilizados. Ele representa a probabilidade de genes tomados, ao acaso, de cada indivíduo serem idênticos por descendência (JIN; HE; LU, 2006; VEKEMANS; HARDY, 2004).

A estrutura genética espacial está relacionada à dinâmica da endogamia biparental, depressão por endogamia e seleção natural. Isso ocorre, pois a distribuição espacial pode estar associada à probabilidade de cruzamento e parentesco, principalmente, em espécies polinizadas por animais nas quais há tendência de indivíduos mais próximos se intercruzarem mais que indivíduos amplamente espaçados (MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2005).

A estrutura genética espacial positiva indica a localização próxima de indivíduos aparentados dentro de uma população. Além disso, pode indicar, também, a ocorrência de cruzamentos endogâmicos. Esse tipo de informação é

relevante para conservação, pois implica na distância mínima entre indivíduos que deve ser respeitada na coleta de sementes para programas de melhoramento ou para recuperação de áreas degradadas visando à manutenção da diversidade genética (MELO JÚNIOR et al., 2015).

A ocorrência de estrutura genética espacial em populações indica que maiores tamanhos populacionais efetivos devem ser levados em consideração para conservação uma vez que a endogamia e o parentesco reduzem o tamanho efetivo populacional (MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2005). Assim, o conhecimento da estrutura genética espacial auxilia no desenvolvimento de estratégias adequadas para coleta de sementes visando à preservação *ex situ* e seleção de populações para conservação *in situ* (JIN; HE; LU, 2006).

2.3.3 Tamanho efetivo populacional, deriva genética e endogamia

O tamanho efetivo populacional (N_e) diz respeito ao número de indivíduos que contribui, geneticamente, com a próxima geração, reproduzindo de forma a manter a variabilidade genética dos descendentes (PIÑA-RODRIGUES; FREIRE; SILVA, 2007). O tamanho populacional é um fator extremamente importante no monitoramento da diversidade genética (WU et al., 2015).

A deriva genética é a mudança aleatória, na frequência alélica, que ocorre de uma geração para outra pela amostragem. Geralmente, em populações grandes, as alterações, nessas frequências, são pouco significativas. Contudo, em populações pequenas (< 100 indivíduos), as frequências alélicas estão sujeitas a mudanças grandes e imprevisíveis (ELLSTRAND; ELAM, 1993; PIÑA-RODRIGUES; FREIRE; SILVA, 2007).

Populações com tamanho efetivo reduzido são mais suscetíveis à perda e reorganização da variação pela deriva genética (ELLSTRAND; ELAM, 1993).

Como nessas populações a seleção é menos efetiva que em populações maiores, alelos deletérios se tornam seletivamente neutros, sendo seu destino determinado pela deriva genética. Consequentemente, esses alelos podem ter suas frequências aumentadas, o que implica na redução do *fitness*. Em longo prazo, a fixação de um número suficiente desses alelos pode levar ao decréscimo populacional e à extinção (FRANKHAM, 2005).

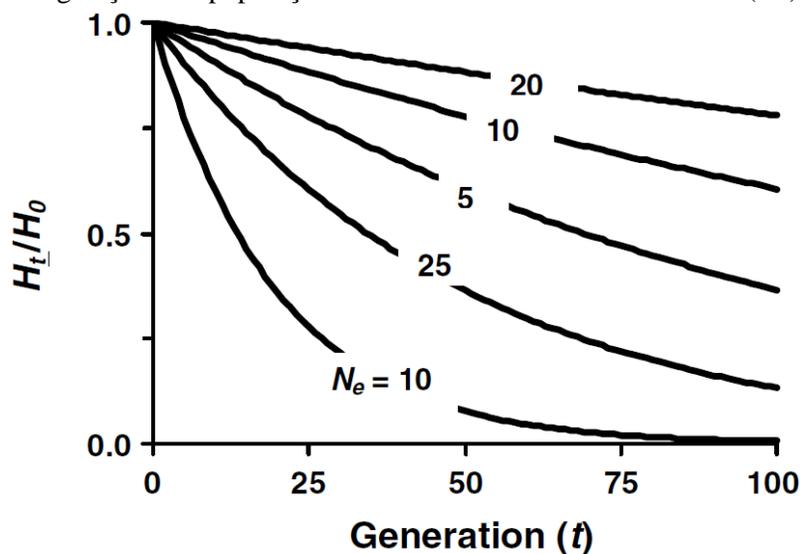
A endogamia, por sua vez, consiste no cruzamento entre indivíduos aparentados. Em plantas, a endogamia, normalmente, ocorre de duas maneiras: (i) autofecundação e (ii) endogamia biparental. A autofecundação é a forma mais extrema de endogamia. Ela pode ser evitada ou minimizada pelos mecanismos de autoincompatibilidade e dioicia, como pode ser observado em algumas espécies arbóreas tropicais (WARD et al., 2005). A endogamia parental ocorre mais comumente em populações pequenas ou quando ocorre estrutura genética espacial (ELLSTRAND; ELAM, 1993).

O cruzamento entre indivíduos aparentados é prejudicial às gerações subsequentes uma vez que reduz a capacidade reprodutiva e de sobrevivência de espécies que, naturalmente, possuem fecundação cruzada. Isso ocorre pelas alterações na produção de espermatozoides, capacidade de cruzamento, fecundidade feminina, sobrevivência juvenil, maturidade reprodutiva e expectativa de vida em animais e componentes relacionados em plantas (FRANKHAM, 2003, 2005).

A depressão por endogamia origina indivíduos com *fitness* reduzido quando comparados àqueles oriundos de cruzamentos não endogâmicos. Dessa forma, a depressão por endogamia é extremamente relevante para espécies ameaçadas uma vez que essas espécies normalmente possuem tamanho populacional reduzido e, consequentemente, o cruzamento entre indivíduos aparentados é inevitável (FRANKHAM, 2005; LI et al., 2012).

O declínio da diversidade genética e o aumento da endogamia dependem do tamanho efetivo populacional genético (FIGURA 2). Normalmente, o tamanho populacional efetivo é menor que o número de adultos potencialmente reprodutores existentes nas populações e que o tamanho populacional bruto (FRANKHAM, 2005).

Figura 2 - Perda proporcional de diversidade genética (H_t/H_0) ao decorrer das gerações em populações com diferentes tamanhos efetivos (N_e).



Fonte: Frankham (2005).

Em pequenas populações, a deriva genética e a endogamia podem ser determinantes da diversidade genética e manutenção da espécie (ELLSTRAND; ELAM, 1993). A deriva genética e a endogamia levam à redução da diversidade genética, o que é uma potencial ameaça à sobrevivência dessas populações (LI et al., 2012; SHAH et al., 2008; WU et al., 2015; ZHOU et al., 2014). Essa redução, na diversidade genética, pode acarretar na diminuição da capacidade de adaptação às mudanças ambientais (potencial evolutivo), o que aumenta o risco de extinção (FRANKHAM, 2005; WU et al., 2015).

Populações submetidas às pressões que levam à redução significativa no tamanho populacional, também, podem apresentar perda de diversidade genética. Isso ocorre porque essas pressões podem gerar estreitamento da base genética (gargalo genético) (ELLSTRAND; ELAM, 1993).

2.3.4 Gargalo genético

Em locos neutros, o número de alelos e suas frequências de populações naturais são produtos do equilíbrio entre mutação e deriva genética. O gargalo genético consiste no desequilíbrio entre mutação e deriva genética gerado pela drástica redução do tamanho efetivo populacional (N_e). Como consequência disso, espera-se que a diversidade de alelos seja reduzida mais rapidamente que a diversidade genética, o que resulta em um excesso de heterozigosidade (CORNUET; LUIKART, 1996).

O gargalo genético é prejudicial às populações. Sua ocorrência pode gerar aumento nas taxas de endogamia, perda de variação genética e fixação de alelos deletérios, além de levar à redução do potencial adaptativo e ao aumento do risco de extinção. Dessa forma, o gargalo genético deve ser evitado, principalmente, em espécies ameaçadas de extinção (CORNUET; LUIKART, 1996).

Existem dois modelos muito utilizados na detecção da ocorrência de gargalo genético: Modelo do Alelo Infinito (*Allele Infinite Model* – IAM) e Modelo de Passos de Mutação (*Stepwise Mutation Model* - SMM). Esses modelos são considerados os dois extremos da amplitude de modelos de mutação (CORNUET; LUIKART, 1996).

De acordo com Kimura e Crow (1964), o Modelo do Alelo Infinito assume que cada mutação gera um novo alelo, previamente inexistente, na população, tendo como base o equilíbrio entre mutação e deriva.

Segundo Kimura e Ohta (1978), Modelo de Passos de Mutação, em sua forma original, considera que as mutações, que provocam mudanças no estado do alelo, ocorrem em taxa única (uma unidade de repetição é adicionada ou removida por geração), em direção positiva ou negativa e essas alterações nos estados dos alelos podem ser expressas por números inteiros (... , A_{-1} , A_0 , A_1 , ...).

A detecção da ocorrência de gargalo genético é muito importante para conservação de espécies, pois as populações que sofreram drástica redução populacional podem não ter tempo suficiente para se adaptar ao baixo tamanho efetivo populacional. Quanto mais rápida a detecção de gargalo, maiores as chances de minimização ou evasão de efeitos deletérios por ações mitigadoras (LEE et al., 2002).

2.3.5 Marcadores moleculares e marcadores ISSR

O desenvolvimento das técnicas bioquímicas e moleculares gerou novas dimensões nos estudos sobre os seres vivos, uma vez que permitiram a análise dos seres vivos em relação ao seu DNA (AGUIAR et al., 2013). Com isso, a estimativa da diversidade genética, para uma série de organismos, tornou-se possível (HAMRICK; GODT, 1996; LOPES, M. et al., 2014).

A análise da diversidade genética compreende o estudo dos níveis inter e intraespecíficos da variação genética. Essa análise das características genéticas das populações depende de uma série de fatores. Dentre eles, a disponibilidade de marcadores moleculares que detectam variabilidade adequada é um dos mais relevantes (CI et al., 2008; GONÇALVES et al., 2014).

Marcadores moleculares são sequências de DNA capazes de caracterizar a variabilidade genética em populações (GONÇALVES et al., 2014). Esse tipo de marcadores possui vantagens sobre os marcadores morfológicos. Dentre elas, pode-se destacar a neutralidade desses marcadores, visto que eles não são

afetados pelo ambiente e estado fisiológico da planta; simplicidade na detecção dos níveis de polimorfismo; acesso rápido (alguns meses) à variação genética de um grande número de indivíduos; utilização de pequenas amostras de tecido (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; PIÑA-RODRIGUES; FREIRE; SILVA, 2007).

O uso de marcadores moleculares, baseados na amplificação do DNA, permitiu avanços no entendimento dos padrões genéticos e relações entre os indivíduos de uma espécie (DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015). Eles têm sido amplamente empregados em estudos de estrutura genética, de maneira a fornecer informações relevantes a respeito da distribuição da variabilidade entre e dentro as populações (GOIS et al., 2014).

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são marcadores moleculares dominantes, baseados na amplificação de fragmentos existentes em distâncias amplificáveis entre dois microssatélites idênticos e repetidos, orientados em direções diferentes (5' ou 3'). ISSR pertencem ao grupo dos marcadores moleculares que usam a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para amplificação dos fragmentos de DNA (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011; HU et al., 2014; LIU et al., 2013; LOPES, M. et al., 2014; MELO JÚNIOR et al., 2015).

Marcadores ISSR são altamente variáveis dentro de uma espécie, apresentam ampla superfície de ancoragem e suportam altas temperaturas de anelamento, o que lhes garante reprodutibilidade e robustez nos resultados (DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015). Esse tipo de marcador, também, possui como características: baixos custos de desenvolvimento; facilidade de transferência dos procedimentos laboratoriais para qualquer espécie de planta; não requer conhecimento prévio do genoma, procedimentos de clonagem ou sondas caracterizadas; alto grau de polimorfismo (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011; CI et al., 2008; DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015; GONÇALVES et al., 2014; LOPES, M. et al., 2014).

Por suas características, marcadores ISSR têm sido amplamente utilizados em estudos genéticos de plantas (ÁLVARES-CARVALHO, 2015; BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011; CI et al., 2008; DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015; GONÇALVES et al., 2014; HU et al., 2014; JIN; HE; LU, 2006; MELO JÚNIOR et al., 2015), inclusive, em espécies ameaçadas de extinção (LIU et al., 2013; LOPES, M. et al., 2014; ZHOU et al., 2014).

2.4 *Dicypellium caryophyllaceum* (Mart.) Ness

Dicypellium caryophyllaceum (Mart.) Ness é uma espécie arbórea da família Lauraceae ocorrente na Amazônia em florestas do Brasil, Peru e Equador (SALOMÃO; ROSA, 2012). Essa espécie é típica das formações florestais de terra firme e Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial) presentes nos estados do Pará e Maranhão (LISTA..., 2016).

Popularmente conhecida como pau-cravo, a espécie, também, é conhecida como cravo-do-maranhão, cravo-do-Pará, cravo-do-mato e canela-cravo. No período colonial do Brasil, *D. caryophyllaceum* sofreu forte devastação por sua casca e inflorescência serem produtos equivalentes ao cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) e à canela-do-ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*, Lauraceae), respectivamente (SALOMÃO; ROSA, 2012).

D. caryophyllaceum (FIGURA 3) é uma árvore de porte médio que atinge, em média, 20 metros de altura. Possui flores miúdas róseo-avermelhadas e com odor forte e agradável. Seus frutos são pequenos, carnosos e, também, bastante aromáticos (SALOMÃO; ROSA, 2012; ZOGHBI; SALOMÃO; GUILHON, 2013).

Figura 3 - *Dicypellium caryophyllaceum*: detalhes das flores e frutos (acima), indivíduos adulto, lenho e indivíduo regenerante (abaixo).



Fonte: Salomão (2008).

O uso do pau-cravo abrange alimentação, perfumaria e medicina (MARTINELLI; MORAES, 2013). No que diz respeito ao potencial econômico, os principais produtos, obtidos de *D. caryophyllaceum*, são madeira e óleo. A madeira do pau-cravo é aromática, amarelada, compacta e resistente, sendo aplicada na construção civil e naval (SALOMÃO; ROSA, 2012). O óleo, extraído da inflorescência e tronco, é uma fonte rica em eugenol (95,5%), substância com propriedades antifúngica, anticarcinogênica, antialérgica, antimutagênica, antioxidante, inseticida, anti-inflamatória e atividades antinociceptiva periférica (SALOMÃO; ROSA, 2012; ZOGHBI; SALOMÃO; GUILHON, 2013).

A forte exploração sofrida pela espécie ao decorrer dos séculos tornou *D. caryophyllaceum* uma espécie extremamente rara no território brasileiro (SALOMÃO; ROSA, 2012). Atualmente, seu nome consta na lista da flora brasileira ameaçada de extinção (BRASIL, 2008) e na lista vermelha de espécies ameaçadas da *International Union for Conservation of Nature* – sob a categoria vulnerável A1cd - (IUCN, 2016), além de fazer parte do Livro Vermelho da Flora do Brasil sob a categoria Criticamente em Perigo (CR) CR A2acd; B2ab (iii,iv) (MARTINELLI; MORAES, 2013).

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar dos benefícios gerados, a instalação de usinas hidrelétricas gera impactos negativos significativos sobre a biodiversidade. Dessa forma, são essenciais ações que subsidiem a efetiva conservação das espécies prejudicadas.

Estudos em conservação genética são essenciais para que a conservação *in situ* e *ex situ* sejam efetivas.

A diversidade genética é fundamental para manutenção das espécies em curto e longo prazo, uma vez que fornece bases para o suporte das perturbações ambientais e adaptação às condições bióticas e abióticas. A baixa diversidade genética é prejudicial, podendo levar à extinção.

Geralmente, espécies que possuem tamanho populacional reduzido, como as espécies ameaçadas de extinção, estão sujeitas à deriva genética e endogamia.

Dicypellium caryophyllaceum (Lauraceae) é uma espécie arbórea que sofreu intensa exploração, o que contribuiu para torná-la rara no território brasileiro e enquadrá-la em listas de espécies ameaçadas de extinção.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA BRASIL. **Belo Monte inicia geração comercial de energia.** Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-04/belo-monte-inicia-geracao-comercial-de-energia>>. Acesso em: 2 ago. 2016.
- AGUIAR, R. V. et al. Variabilidade de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 2, p. 226-233, mar./abr. 2013.
- AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Malden, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, Dec. 2008.
- ÁLVARES-CARVALHO, S. V. et al. *Schinus terebinthifolius*: populations structure and implications for its conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 58, p. 120-125, Feb. 2015.
- BERCHIN, I. I. et al. Energy production and sustainability: a study of Belo Monte hydroelectric power plant. **Natural Resources Forum**, Hoboken, v. 39, n. 3/4, p. 224-237, Aug./Nov. 2015.
- BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. de A.; CARVALHO, D. de. Estrutura genética em microescala especial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 957-964, set./out. 2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa n° 6, de 23 de setembro de 2008. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 set. 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf>. Acesso em: 19 maio 2016.
- BRASIL. Portal Brasil. **Dilma inaugura usina hidrelétrica de Belo Monte.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/governo/2016/05/dilma-inaugura-usina-hidreletrica-de-belo-monte>>. Acesso em: 2 ago. 2016.
- CI, X. Q. et al. AFLP and ISSR analysis reveals high genetic variation and inter-population differentiation in fragmented populations of the endangered *Litsea szemaonis* (Lauraceae) from Southwest China. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 273, n. 3/4, p. 237-246, July 2008.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, Dec. 1996.

CRAIDE, S. **Belo Monte aciona primeira turbina, em fase de teste**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2016-02/belo-monte-aciona-primeira-turbina-em-fase-de-teste>>. Acesso em: 2 ago. 2016.

DUARTE, J. F.; CARVALHO, D. de; VIEIRA, F. de A. Genetic conservation of *Ficus bonijesulapensis* R. M. Castro in a dry forest on limestone outcrops. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 59, p. 54-62, Apr. 2015.

ELETROBRÁS; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Relatório de impacto ambiental: aproveitamento hidrelétrico Belo Monte**. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://norteenergiasa.com.br/site/wp-content/uploads/2011/04/NE.Rima_.pdf>. Acesso em: 17 maio 2016.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plants conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 24, p. 217-242, 1993.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balço energético nacional**. 2015. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2015.pdf>. Acesso em: 17 maio 2016.

FALK, D. A.; KNAPP, E. E.; GUERRANT, E. O. **An introduction to restoration genetics**. Washington: Society for Ecological Restoration, 2001. 32 p.

FERREIRA, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA; CENARGEN, 1998. 220 p.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 326, p. S22-S29, Aug. 2003.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, Oxford, v. 126, n. 2, p. 131-140, Nov. 2005.

GOIS, I. B. et al. Diversidade genética entre indivíduos de *Spondias lutea* L. procedentes do baixo São Francisco sergipano, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 36, n. 2, p. 261-269, mar./abr. 2014.

GONÇALVES, L. O. et al. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 290-298, jun. 2014.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 351, n. 1345, p. 1291-1298, Sept. 1996.

HEDRICK, P. W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 16, n. 11, p. 629-636, Nov. 2001.

HU, Z. Y. et al. Genetic diversity and differentiation among populations of *Bretschneidera sinensis* (Bretschneideraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 56, p. 104-110, Oct. 2014.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **The IUCN red list of threatened species**. Version 2015-4. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 11 maio 2016.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD WILDLIFE FUND. **World conservation strategy: living resource conservation for sustainable development**. Gland, 1980. 77 p.

JIN, Y.; HE, T. H.; LU, B. R. Genetic spatial clustering: significant implications for conservation of wild soybean (*Glycine soja*: Fabaceae). **Genetica**, Dordrecht, v. 128, n. 13, p. 41-49, Sept. 2006.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por diferentes marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 93-107, dez. 2003.

KARRON, J. D. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (Ed.). **Genetics and**

conservation of rare plants. New York: Oxford University Press, 1991. p. 87-98.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, Baltimore, v. 49, n. 4, p. 725-738, 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 75, n. 6, p. 2868-2872, 1978.

LEE, S. L. et al. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of virgin jungle reserves in peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 89, n. 3, p. 447-459, Mar. 2002.

LESSA, A. C. R. et al. Emissions of greenhouse gases in terrestrial areas pre-existing to hydroelectric plant reservoirs in the Amazon: the case of Belo Monte hydroelectric plant. **Renewable e Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 51, p. 1728-1736, Nov. 2015.

LI, Y. Y. et al. Genetic decline and inbreeding depression in an extremely rare tree. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 343-347, Apr. 2012.

LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2016. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB17928>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

LIU, J. et al. Genetic diversity of natural populations of *Machilus thunbergii*, an endangered tree species in eastern China, determined with ISSR analysis. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 3689-3697, 2013.

LOPES, M. S. et al. Genetic diversity of an Azorean endemic and endangered plant species inferred from inter-simple sequence repeat markers. **AOB Plants**, Oxford, v. 6, n. 34, p. 1-15, June 2014.

LOPES, S. de F. et al. Landscape changes and habitat fragmentation associated with hydroelectric plants reservoirs: insights and perspectives from a Central Brazilian case history. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 4, p. 1205-1212, July/Aug. 2014.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. D. (Org.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: A. Jakobsson; Instituto de Pesquisas “Jardim Botânico do Rio de Janeiro”, 2013. 1100 p.

MCNEELY, J. A. et al. Biological diversity: what it is and why it is important. In: _____. **Conserving the world's biological diversity**. Gland: IUCN, 1990. p. 17-23.

MELO JÚNIOR, A. F. et al. Spatial genetic structure of *Cavanillesia arborea* K. Schum. (Malvaceae) in seasonally dry Tropical forest: implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 58, p. 114-119, Feb. 2015.

MORAES, M. L. T. de; 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, MG, v. 29, n. 2, p. 281-289, abr. 2005.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FREIRE, J. M.; SILVA, L. D. Parâmetros genéticos para colheita de sementes de espécies florestais. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. et al. (Ed.). **Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais**. Seropédica: Ed. UFRRJ, 2007. p. 51-102.

SALOMÃO, R. de P. *Dicypellium caryophyllaceum*: detalhes das flores e frutos (acima), indivíduos adulto, lenho e indivíduo regenerante (abaixo). 2008. 1 fotografia.

SALOMÃO, R. de P.; ROSA, N. de A. Pau-cravo: ‘droga do sertão’ em risco de extinção. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 289, p. 46-50, jan./fev. 2012.

SANTOS, T. S. et al. Belo Monte: impactos sociais, ambientais, econômicos e políticos. **Tendências**, Pasto, v. 13, n. 2, p. 214-227, jul./dez. 2012.

SHAH, A. et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered species *Taxus fuana* (Taxaceae) from Pakistan and implications for its conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 184-193, Mar. 2008.

SOUSA JUNIOR, W. C. de; REID, J. Uncertainties in Amazon hydropower development: risk scenarios and environmental issues around the Belo Monte dam. **Water Alternatives**, Washington, v. 3, n. 2, p. 249-268, June 2010.

STICKLER, C. M. et al. Dependence on hydropower energy generation on forests in the Amazon Basin at local and regional scales. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 23, p. 9601-9606, June 2013.

THOMAS, E. et al. Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 333, p. 66-75, Dec. 2014. Special edition.

TORO, M. A.; CABALLERO, A. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 360, n. 1459, p. 1367-1378, July 2005.

TUNDISI, J. G.; MATSUMARA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. E. M. Environmental impact assessment of reservoir construction: new perspectives for restoration economy, and development: the Belo Monte Power Plant case study. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 3, p. S10-S15, Aug. 2015. Supplement.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analysis in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 921-935, Apr. 2004.

VINSON, C. C. et al. Population genetics of naturally rare tree *Dimorphandra wilsonii* (Caesalpinioideae) of the Brazilian Cerrado. **Tree Genetics e Genomes**, Heidelberg, v. 11, n. 46, p. 1-10, June 2015.

WARD, M. et al. To self, or not to self...: a review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, London, v. 95, n. 4, p. 246-254, Oct. 2005.

WU, F. Q. et al. Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world's largest Rhododendron. **AOB Plants**, Oxford, v. 7, n. 82, p. 1-9, 2015.

ZHOU, T. H. et al. Genetic diversity of the threatened Chinese endemic plant, *Sinowilsonia henryi* Hensl. (Hamamelidaceae), revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 56, p. 171-177, Oct. 2014.

ZOGHBI, M. G. B.; SALOMÃO, R. P.; GUILHON, G. M. S. P. Leaf essential oils of *Dicypellyum caryophyllaceum* (Mart.) Ness (Lauraceae): an almost extinct species in the Amazon. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, New Delhi, v. 1, n. 2, p. 19-21, 2013.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO – Diversidade genética de *Dicypellium caryophyllaceum* na Área de Influência Direta da Usina Hidrelétrica Belo Monte

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme instrução da 2ª edição do Manual de Normalização e Estrutura de trabalhos acadêmicos da UFLA (2016).

RESUMO

A instalação da Usina Hidrelétrica Belo Monte causa uma série de impactos na Baía do Rio Xingu. Dentre os impactos sobre o ambiente, a perda da biodiversidade é um dos mais evidentes. O pau-cravo (*Dicypellium caryophyllaceum*, Lauraceae) é uma espécie arbórea que, no Brasil, é encontrada nos estados do Maranhão e Pará. As características aromáticas de sua casca e inflorescência fizeram com que a espécie fosse intensamente explorada desde o período colonial brasileiro, o que tornou a espécie extremamente rara no Brasil. Esse estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética de uma população natural de *Dicypellium caryophyllaceum* (Lauraceae) utilizando-se 22 *primers* ISSR. A população estudada está localizada na Área de Influência Direta da Usina Hidrelétrica Belo Monte, em Altamira (Pará). Dos 180 fragmentos identificados, 125 foram polimórficos (69,44%). O número de alelos (N_a), número de alelos efetivos (N_e), heterozigosidade esperada (H_e) e Índice de Shannon (I) foram, respectivamente, 1,672, 1,470, 0,266 e 0,389. Foram identificadas, também, a ocorrência de gargalo genético ($P = 0,03125$) e estrutura genética espacial para distância geográfica de 21 m ($P = 0,019$). A população analisada apresenta moderada diversidade genética, passível de ser explorada em programas de conservação genética. Apesar da exploração econômica do pau-cravo, durante séculos, ter contribuído para sua drástica redução populacional, a população estudada não mostrou perdas significativas na diversidade genética. O reduzido tamanho populacional e isolamento de populações podem proporcionar a deriva genética e endogamia, o que aumenta o risco de extinção da espécie.

Palavra-chave: Conservação genética. Marcador molecular. Pau-cravo.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil detém uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo. As fontes hidrelétricas contribuem, significativamente, com esse quadro uma vez que correspondem a, aproximadamente, 65% da oferta energética interna (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE, 2015).

A Bacia Amazônica é uma região que apresenta elevado potencial hidrelétrico sendo o Rio Xingu um dos seus principais rios. A Bacia do Rio Xingu é, extremamente, relevante para o patrimônio cultural e natural brasileiro. Essa região é considerada um complexo histórico e etnográfico, além de possuir elevada diversidade biológica (BERCHIN et al., 2015; IVANAUSKAS; MONTEIRO; RODRIGUES, 2008). Nessa Bacia, encontra-se a Usina Hidrelétrica Belo Monte (UHEBM), o terceiro maior complexo hidrelétrico do mundo, atrás apenas de Itaipu, no Brasil e Paraguai, e Três Gargantas, na China (BERCHIN et al., 2015).

Apesar dos benefícios gerados, a instalação da UH Belo Monte traz consigo impactos significativos na qualidade de vida dos moradores locais e nos ecossistemas existentes. As mudanças na paisagem, intensificação do tráfego, crescimento demográfico, alterações na qualidade da água, destruição de fontes de subsistência indígenas, perda da biodiversidade e patrimônio cultural, são alguns exemplos de impactos ambientais e sociais causados pela instalação da UHE Belo Monte (BERCHIN et al., 2015).

A construção de barragens, para aproveitamento hidrelétrico, interrompe a continuidade dos ambientes ripários. Isso pode levar à restrição do fluxo gênico de plantas e animais, deteriorando a diversidade funcional e genética ao longo do tempo e expondo as populações a drásticas mudanças no ambiente (LOPES et al., 2014).

Frequentemente, populações naturais enfrentam perturbações ambientais como novas doenças, pestes, parasitas, competidores e predadores, poluição, eventos climáticos e mudanças climáticas induzidas por ações antrópicas. Para evoluir e superar essas novas condições, as espécies precisam da diversidade genética (DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015; FRANKHAM, 2003; LIU et al., 2013). Por serem organismos sésseis, espécies arbóreas apresentam altos níveis de diversidade genética, inclusive, maiores que os níveis de espécies de ciclo de vida mais curtos, como herbáceas (VEKEMANS; HARDY, 2004; WU et al., 2015).

A diversidade genética em populações de espécies arbóreas é bastante variada. Geralmente, populações pequenas apresentam menor diversidade genética quando comparadas com espécies que ocorrem em grandes populações (FRANKHAM, 2003). Isso ocorre pela ação da deriva genética e endogamia. Dessa forma, espécies raras e ameaçadas de extinção, com distribuição geográfica limitada, normalmente, apresentam menores níveis de diversidade genética que aquelas amplamente distribuídas (WU et al., 2015).

A estimativa dos níveis e da distribuição da diversidade genética em espécies ameaçadas é um dos principais objetivos da genética da conservação (HU et al., 2014; ZHOU et al., 2014). Em geral, o manejo dos recursos genéticos de populações selvagens de espécies ameaçadas de extinção é pouco efetivo (FRANKHAM, 2003). Estudos a respeito da diversidade genética dessas espécies podem auxiliar no conhecimento de seu processo evolucionário, mecanismos responsáveis por sua suscetibilidade e determinação de informações que podem ser aplicadas na sua proteção (LIU et al., 2013).

Dicypellium caryophyllaceum (Lauraceae) é uma espécie arbórea com ocorrência nas florestas da Amazônia no Brasil, Peru e Equador. Por ser considerada uma especiaria, essa espécie foi fortemente explorada, desde o período colonial do Brasil, o que levou a sua drástica redução populacional

(SALOMÃO; ROSA, 2012). Atualmente, essa espécie consta na Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção (BRASIL, 2008), lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES - IUCN, 2016) e no Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI; MORAES, 2013).

D. caryophyllaceum foi redescoberta, recentemente, na Área Diretamente Afetada (ADA) da Usina Hidrelétrica de Belo Monte (LEMONS et al., 2015) e inserida no Plano de Ação Nacional para a conservação das espécies da Flora ameaçadas de extinção da Região do Médio e Baixo Xingu (PAN Xingu Flora). Isso reforça a necessidade de ampliação do conhecimento a respeito desta espécie pouco conhecida e que apresenta alto potencial econômico. Assim, faz-se necessário o estudo da diversidade genética destas populações/indivíduos remanescentes para a elaboração de plano de conservação *in situ* e *ex situ* e reintrodução da espécie na região.

Portanto o principal objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética de uma população natural de *D. caryophyllaceum* (Lauraceae) existente na Área de Influência Direta da Usina Hidrelétrica Belo Monte em Altamira, Pará. Além disso, buscou-se, também, (i) verificar a ocorrência de estrutura genética espacial e (ii) identificar a existência de gargalo genético.

2. MATERIAL E MÉTODOS

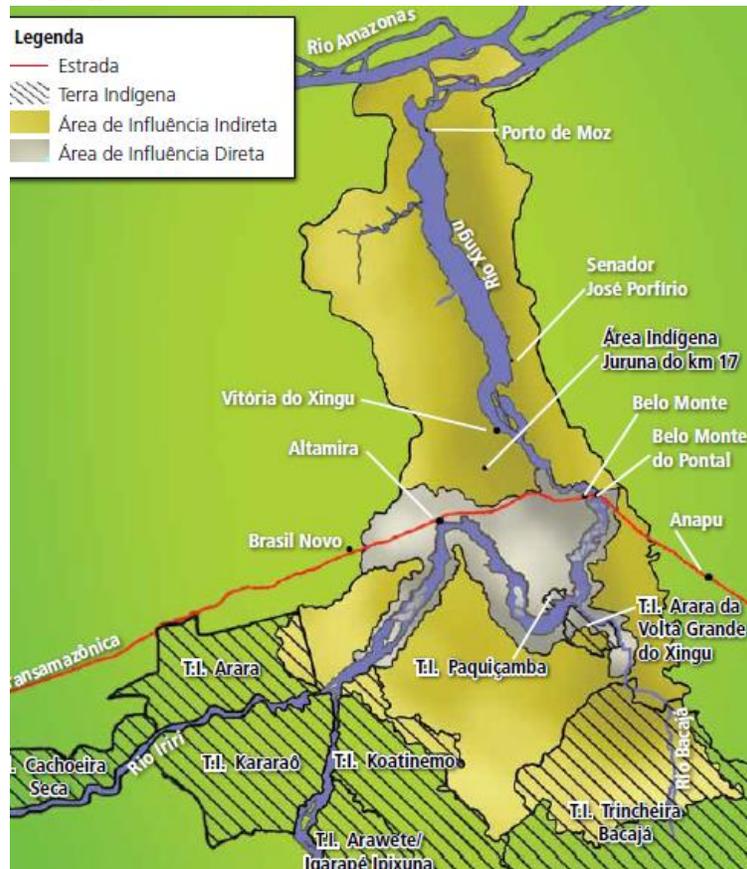
2.1 Área de estudo

A Usina Hidrelétrica Belo Monte (UHEBM) está localizada em um trecho do Rio Xingu (Pará) denominado Volta Grande (FIGURA 4). Esse trecho está situado entre a cidade de Altamira e as localidades de Belo Monte e Belo Monte do Pontal, pertencentes aos municípios de Vitória do Xingu e Anapu, respectivamente (LEMOS et al., 2015). A paisagem de Volta Grande do Rio Xingu apresenta-se ocupada por diferentes formas de uso, desde formações vegetacionais nativas até a criação extensiva de gado e agricultura (SOUSA JUNIOR; REID, 2010).

A Área de Influência Direta (AID) compreende as áreas adjacentes à UHEBM e seu reservatório (FIGURA 4). Essa área abrange os municípios de Altamira, Anapu, Brasil Novo, Senador José Porfírio e Vitória do Xingu (ELETROBRÁS; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2009).

A vegetação existente na AID é variável, com ocorrência de florestas de terra firme, florestas aluviais e vegetação ocorrente nos ambientes de pedrais. Nos últimos 30 anos, a vegetação, ocorrente na AID, vem sofrendo com o desmatamento, visto que 35% estão alterados, restando apenas pequenos trechos de florestas (ELETROBRÁS; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2009).

Figura 4 - Volta Grande (Pará) e a localização da Usina Hidrelétrica Belo Monte.



Fonte: Eletrobrás e Ministério de Minas e Energia (2009).

2.2 Espécie estudada

Dicypellium caryophyllaceum (Mart.) Ness (Lauraceae), vulgarmente conhecida como pau-cravo e canela-cravo, é uma espécie arbórea típica das formações florestais de terra firme e Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial) ocorrente na Amazônia brasileira (Pará e Maranhão), peruana e equatoriana (LISTA..., 2016; SALOMÃO; ROSA, 2012). Os indivíduos arbóreos atingem, em média, 20 metros de altura e possuem flores pequenas róseo-avermelhadas

com forte odor e frutos pequenos, carnosos e, também, bastante aromáticos (SALOMÃO; ROSA, 2012; ZOGHBI; SALOMÃO; GUILHON, 2013).

No que diz respeito ao uso, *D. caryophyllaceum* é utilizado nos ramos da alimentação, perfumaria e medicina (MARTINELLI; MORAES, 2013). A madeira e o óleo essencial (extraído de sua inflorescência e tronco) são seus principais produtos, sendo o primeiro, empregado na construção civil e naval e o segundo, na obtenção de eugenol, substância com diversas propriedades biológicas (fungicida, anticarcinogênico, antialérgico, antimutagênico, antioxidante, inseticida e anti-inflamatório, além de atividades antinociceptivas periféricas) (SALOMÃO; ROSA, 2012; ZOGHBI; SALOMÃO; GUILHON, 2013).

No período colonial do Brasil, *D. caryophyllaceum* era considerada grande concorrente ao cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) e canela-do-ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*, Lauraceae), sendo mais vantajosa que essas espécies por permitir a extração da canela e do cravo na mesma planta. Os aumentos no consumo interno e nas exportações contribuíram fortemente para tornar a espécie cada vez mais rara, colocando-a em risco de extinção (SALOMÃO; ROSA, 2012). Atualmente, seu nome consta na lista da flora brasileira ameaçada de extinção (BRASIL, 2008) e na lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza – sob a categoria vulnerável A1cd - (IUCN, 2016), além de fazer parte do Livro Vermelho da Flora do Brasil sob a categoria Criticamente em Perigo (CR) CR A2acd; B2ab (iii,iv) (MARTINELLI; MORAES, 2013).

D. caryophyllaceum é uma espécie pouco conhecida, cientificamente, visto que poucas populações foram identificadas em pesquisas (LEMOS et al., 2015; SALOMÃO; ROSA, 2012). Provavelmente, com base na classificação de espécies raras, proposta por Karron (1991), *D. caryophyllaceum* se enquadra no

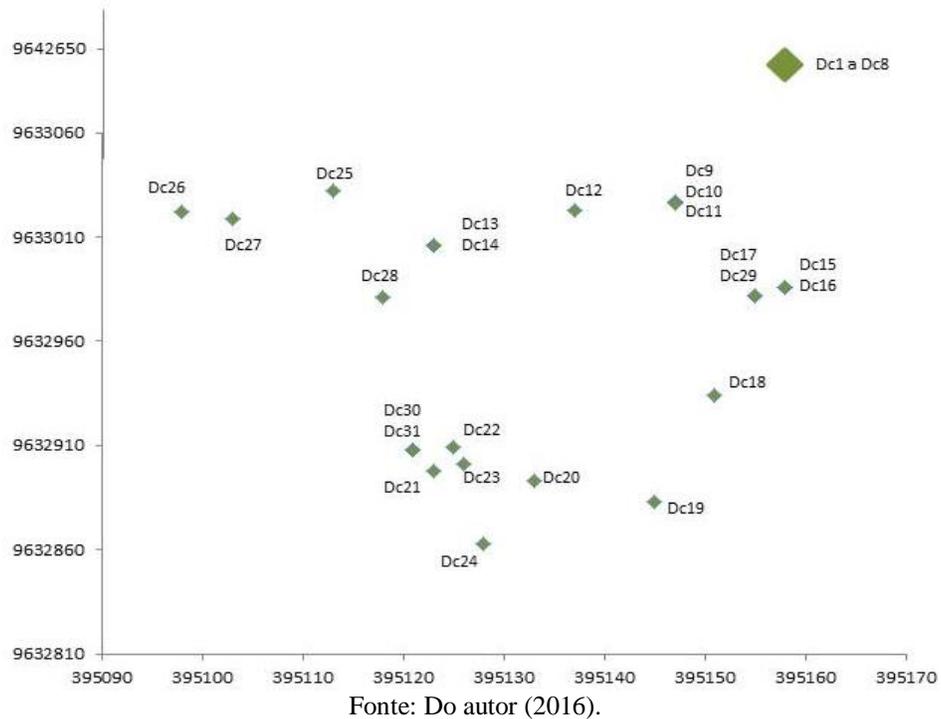
grupo de espécies endêmicas cuja distribuição se restringe entre uma e cinco populações.

2.3 Amostragem

Originalmente, a amostragem seria feita com 41 indivíduos arbóreos de *D. caryophyllaceum* encontrados na Área de Influência Direta da Usina Hidrelétrica de Belo Monte, em Altamira (PA). Contudo a não localização de dez indivíduos fez com que a amostragem contemplasse 31 indivíduos. Em Junho de 2014, esses indivíduos foram localizados, identificados com placas de alumínio e suas coordenadas geográficas foram obtidas com um aparelho GPS de navegação. Amostras de tecido foliar foram coletadas, identificadas, armazenadas em sílica gel e, posteriormente, enviadas para o Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas do Departamento de Ciências Florestais (DCF) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Na Figura 5, é mostrada a distribuição espacial dos indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum* amostrados (coordenadas UTM). É importante ressaltar que esses foram os únicos indivíduos encontrados.

Figura 5 - Distribuição espacial dos indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum* amostrados com base em suas coordenadas UTM.



2.4 Extração do DNA genômico e amplificação

As análises foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Florestal e Conservação Genética do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (DCF - UFLA).

As extrações foram realizadas, segundo o protocolo Mogg e Bond (2003), com algumas alterações, que é recomendado para amostras liofilizadas ou dessecadas em sílica gel. Do tecido foliar amostrado de cada indivíduo, retirou-se seção de, aproximadamente, 1 cm² que foi macerada com 600 µL tampão de extração (100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA 0,5 M pH 8,0; 500mM de NaCl 5M; 0,7% de SDS 7%; 50 µg.mL⁻¹ de Proteinase K 10 mg.mL⁻¹

¹; e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de RNase 10 mg.mL^{-1}). Os produtos da maceração foram colocados em microtubos de 1,5 mL os quais, por sua vez, foram mantidos em estufa a 37°C por, aproximadamente, 12 horas. Após a incubação, adicionaram-se 260 μL de NaCl 5M nos microtubos que, após agitação, foram centrifugados, por 5 minutos, a 12000 rpm. Após a retirada dos microtubos da centrífuga, o sobrenadante (fase superior aquosa) foi transferido para novos microtubos que continham 800 μL de isopropanol gelado. Posteriormente, os microtubos foram armazenados a -20°C, por 3 horas, para precipitação do DNA. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas, por 10 minutos, a 12000 rpm e a 4°C. Os microtubos foram centrifugados a 4000 rpm, por 10 minutos, após a adição de 500 μL de etanol 70%. Os pellets foram deixados à temperatura ambiente para secar. Então, os ácidos nucleicos foram solubilizados em 50 μL de TE.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 22 *primers* ISSR. As reações foram preparadas em microplacas para PCR (PCR-96-Axygen Scientific), sendo que em cada poço foram colocados 3 μL de DNA (diluição 1:100) e 10 μL de mix de reação [1,5 mM de tampão IB Phoneutria (constituído de 100 mM de Tris-HCl pH 8,4; 500 mM de KCl; 1% Triton X-100; 15 mM de MgCl_2), 1,5 mM de dNTP, 1 U de Taq polimerase (5 $\text{u}/\mu\text{L}$), 2 mM de cada primer e completado o volume final com água ultrapura (4,85 μL)]. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa de iniciação de 2 minutos a 94°C, seguidos de 37 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C, 1 minuto a 72°C e uma etapa de alongação final de 7 minutos a 72°C. As reações de amplificação foram realizadas em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 e seus resultados foram analisados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,5% e coloração com brometo de etídeo.

2.5 Análise dos dados

A construção da matriz binária, utilizada nas análises estatísticas, foi feita com base na presença (1) e ausência (0) dos fragmentos ISSR resultantes da amplificação.

2.5.1 Diversidade genética

A análise da diversidade genética foi feita por meio da estimativa da porcentagem de locos polimórficos (P), número total de alelos (N_a), número de alelos efetivos (N_e), heterozigosidade esperada (H_e), de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weimberg e Índice de Shannon (I). O Índice de Shannon foi calculado utilizando-se o programa PopGene (YEH; YANG; BOYLE, 1997), enquanto os demais parâmetros foram calculados pelo programa Genalex (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

A porcentagem de locos polimórficos (P) foi calculada pela relação entre o número total de locos polimórficos encontrados e o número total de locos analisados.

A heterozigosidade esperada (H_e), proposta por Nei (1978), para cada loco, foi calculada pela fórmula:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2 \quad (1)$$

em que p_i é a frequência do alelo i na população analisada, A heterozigosidade esperada, para população, foi obtida pela média aritmética de H_e para todos os locos.

O Índice de Shannon (I) de diversidade fenotípica foi calculado pela fórmula:

$$I = - \sum p_i \ln p_i / n \quad (2)$$

em que p_i é a frequência da banda e n é o número de marcas avaliadas.

A análise da suficiência do número de bandas polimórficas foi realizada no programa Genes (CRUZ, 1998) utilizando-se método *bootstrap*. Para ser considerado efetivo na determinação da diversidade genética, o valor de estresse, que representa a correlação entre a matriz original e simulada, deve ser menor que 0,05 (DUARTE; CARVALHO; VIEIRA, 2015).

2.5.2 Análise de agrupamento dos indivíduos

Para verificar o nível de dissimilaridade entre os indivíduos integrantes da população, foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA), a qual foi baseada em uma matriz de distâncias genéticas. Essa análise foi realizada pelo programa GeneAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Utilizando-se programa NTSys (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 2000), foi feita uma análise de agrupamento, para verificar a similaridade genética entre os indivíduos amostrados, utilizando-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Mean*).

2.5.3 Estrutura genética espacial

A análise da estrutura genética espacial foi feita no programa SPAGeDi (HARDY; VEKEMANS, 2002) por meio da estimativa do coeficiente *kinship* de coancestria. Esse coeficiente representa a probabilidade de dois genes, tomados ao acaso, serem idênticos por descendência (HARDY, 2003), sendo calculado

entre pares de indivíduos dentro de classes de distâncias geográficas. O coeficiente *kinship* (F_{ij}) é obtido pela fórmula:

$$F_{ij} = \frac{Q_{ij} - Q_m}{1 - Q_m} \quad (3)$$

em que F_{ij} é o coeficiente de coancestria entre i e j ; Q_{ij} corresponde à probabilidade de genes, tomados ao acaso, serem idênticos em razão do parentesco; e Q_m representa a probabilidade de dois genes serem idênticos por descendência em uma população de referência ou amostra de referência.

Os intervalos de confiança a 95% de probabilidade, para o coeficiente médio de coancestria, foram obtidos pela reamostragem *jackknife* e utilizando-se as estimativas do erro padrão da média. A identificação da ocorrência de estrutura genética espacial foi feita, com base em 1.000 permutações, para cada classe de distância (HARDY; VEKEMANS, 2002).

2.5.4 Gargalo genético

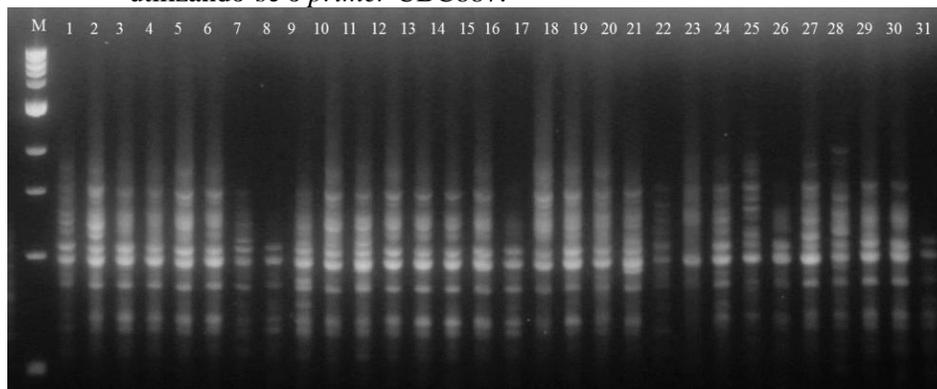
A verificação de recente e significativa redução no tamanho efetivo populacional (gargalo genético) foi feita com uso do programa Bottleneck (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999), utilizando-se os modelos do alelo infinito (IAM) e o de passos de mutação (SMM), propostos por Kimura e Crow (1964) e Kimura e Ohta (1978), respectivamente. Os dois modelos foram testados, porque eles representam os dois extremos dos modelos de mutação e, provavelmente, um modelo intermediário seria mais adequado para maioria dos locos (CORNUET; LUIKART, 1996).

A significância do ajuste do modelo mais adequado foi analisada pelo teste hierárquico de Wilcoxon (*Wilcoxon signed rank test*), com base em 1.000 repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 22 *primers* ISSR utilizados mostraram-se adequados, gerando bandas robustas, de boa intensidade e com bom perfil de amplificação. Esses *primers* produziram 180 bandas e o número de bandas por *primer* variou de cinco (UBC809, UBC845, UBC842 e UBC902) a 15 (UBC807). A média e o desvio padrão de bandas por *primer* foram 8,18 e 2,68, respectivamente. Os resultados da amplificação mostram um elevado monomorfismo (FIGURA 6). Das 180 bandas identificadas, 125 (69,44%) são polimórficas e 55 (30,56%) monomórficas. Os *primers* ISSR utilizados e seus respectivos números de bandas obtidos são apresentados na Tabela 1.

Figura 6 - Amplificação de DNA de indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum* utilizando-se o *primer* UBC887.



M: marcador de peso molecular (1 kb); 1 – 31: indivíduos amostrados.

Fonte: Do autor (2016).

Tabela 1 - *Primers* ISSR utilizados para amplificação do DNA dos indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum*, suas sequências e número de bandas reveladas (continua).

<i>Primer</i>	Sequência	Nº de bandas
UBC807	(AG) ₈ -T	15
UBC808	(AG) ₈ -C	10
UBC809	(AG) ₈ -G	5

Tabela 2 - *Primers* ISSR utilizados para amplificação do DNA dos indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum*, suas sequências e número de bandas reveladas (conclusão).

<i>Primer</i>	Sequência	Nº de bandas
UBC825	(AC)8-T	5
UBC827	(AC)8-G	9
UBC834	(AG)8-YT	8
UBC835	(AG)8-YC	8
UBC841	(GA)8-YC	6
UBC842	(GA)8-YG	5
UBC844	(CT)8-RC	7
UBC855	(AC)8-YT	9
UBC557	(AC)8-YG	12
UBC864	(ATG)6	8
UBC887	DVD(TC)7	9
UBC889	DBD(AC)7	10
UBC901	(GT)6-YR	7
UBC902	(GT)6-AY	5
Chris	(CA)7-YG	8
John	(AG)7-YC	6
Manny	(CAC)4-RC	13
Omar	(GAG)4-RC	9
Terry	(GTG)4-RC	6
Total	-	180

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T)

Fonte: Do autor (2016).

Em estudo sobre a diversidade genética de três espécies arbóreas da família Lauraceae, utilizando dez marcadores ISSR, Zhang et al. (2012) encontraram, no total, 113 bandas, sendo 107 bandas encontradas na espécie *Phoebe chekiangensis* (111 indivíduos amostrados) e 111 encontradas nas espécies *Phoebe bournei* (110 indivíduos amostrados) e *Machilus pauhoi* (45 indivíduos amostrados). O número de bandas por *primer* variou de 9 a 14. Os números de locos polimórficos foram 88 (82,24%), 102 (91,89%) e 104

(93,69%), para as espécies *P. chekiangensis*, *P. bournei* e *M. pauhoi*, respectivamente.

Liu et al. (2013) analisaram a diversidade genética de 205 indivíduos da espécie ameaçada *Machilus thunbergii* (Lauraceae), usando oito marcadores ISSR e detectaram, ao todo, 92 bandas e 84 (91,30%) desses locos eram polimórficos. O número de bandas por *primer* variou de 6 a 11.

Em estudo sobre a diversidade genética de *Ocotea odorífera* (Lauraceae), utilizando cinco *primers* ISSR, 44 bandas foram registradas, sendo 40 polimórficas (RIBEIRO, R.M., 2016, informação pessoal).

Na Tabela 2, estão sintetizados os resultados de estudos de diversidade genética de espécies da família Lauraceae, com base em marcadores ISSR.

Tabela 3 - Resultados encontrados para diversidade genética de espécies da família Lauraceae utilizando marcadores ISSR.

Espécie	NIA	NPU	NBI	<i>P</i>	<i>H_e</i>	<i>I</i>	Fonte
<i>P. chekiangensis</i>	111	10	107	82,24	0,195	0,294	Zhang et al. (2012)
<i>P. bournei</i>	110	10	111	91,89	0,259	0,388	Zhang et al. (2012)
<i>M. pauhoi</i>	45	10	111	93,69	0,347	0,505	Zhang et al. (2012)
<i>M. thunbergii</i>	210	8	92	91,30	0,234	0,370	Liu et al. (2013)
<i>O. odorífera</i>	56	5	44	90,91	0,330	0,492	Ribeiro, R. M. (2016)
<i>D. caryophyllaceum</i>	31	22	180	69,44	0,266	0,389	Do autor (2016)

NIA: número de indivíduos amostrados; NPU: número de *primers* utilizados; NBI: número de bandas identificadas; *P*: polimorfismo (%); *H_e*: heterozigosidade esperada; *I*: Índice de Shannon.

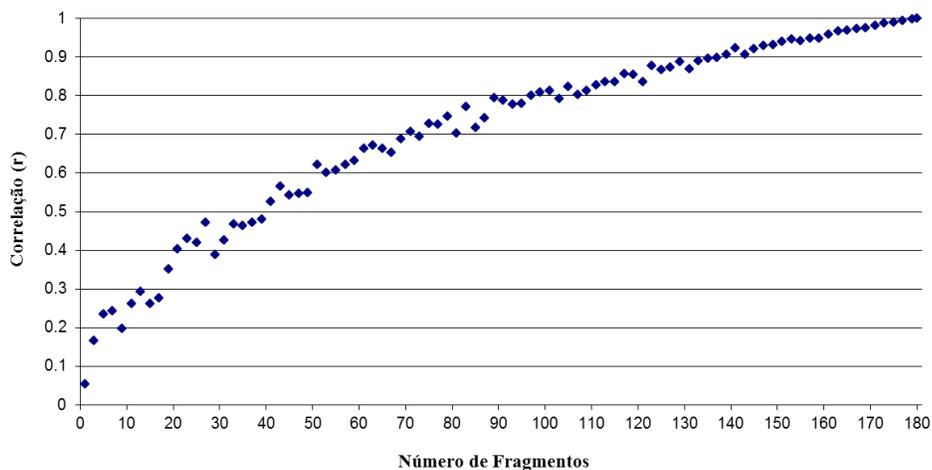
Fontes: Do autor (2016), Liu et al. (2013), Ribeiro, R. M. (2016) e Zhang et al. (2012).

Estudos que abordam a diversidade e estrutura genética de espécies arbóreas, utilizando marcadores ISSR, empregam um número variável de

primers. De modo geral, o número máximo de *primers* ISSR tem sido em torno de 10.

Como o número de bandas é bastante variável entre as espécies da mesma família, a análise do número de bandas indica a suficiência para a continuidade das análises. A análise mostrou que a utilização de 82 bandas resulta no valor de estresse e correlação de 0,048 e 0,75, respectivamente. A Figura 7 mostra a análise e a correlação das bandas utilizadas.

Figura 7 - Número de bandas utilizadas para análises da diversidade genética em indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum*.



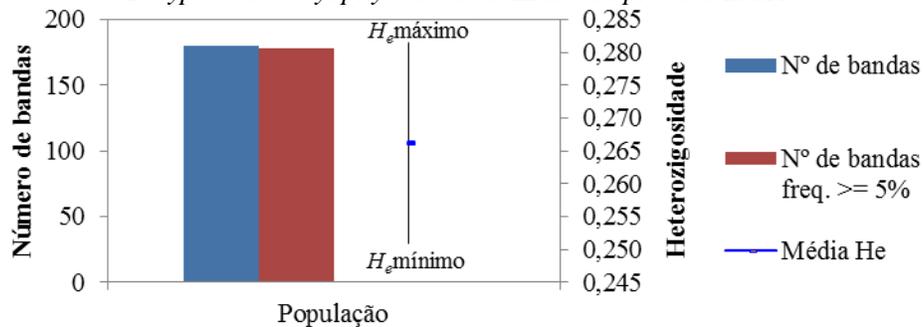
Número de Fragmentos
Fonte: Do autor (2016).

Alguns dados de análise de suficiência amostral com marcadores ISSR mostram que o número de bandas polimórficas, para *Ficus bonijesulapensis* de 63, foi considerado ótimo, para análise da diversidade genética (valor de estresse < 0,05 e correlação de 0,97) (DUARTE; VIEIRA; CARVALHO, 2015); 55, para *Myrcia splendens* (valor de estresse < 0,05 e correlação de 0,96) (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011); para *Ceiba pubiflora* foi de 87 bandas (valor de estresse < 0,05 e correlação de 0,98) (BRANDÃO, 2012).

Nybom (2004), em estudo que analisou dados compilados de pesquisas que utilizaram marcadores moleculares, na estimativa da diversidade genética intraespecífica, obteve um valor médio de 54,9 bandas para o número de marcadores ISSR.

A Figura 8 ilustra o padrão de bandas e a heterozigosidade obtida pelos indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum* amplificados pelos *primers* ISSR.

Figura 8 - Padrão de bandas e a heterozigosidade (H_e) obtida pelos indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum* com uso de *primers* ISSR.



Fonte: Do autor (2016).

No presente estudo, o número de bandas (180) obtido foi mais que suficiente, para o estudo da diversidade genética de *D. caryophyllaceum*, o que permitiu precisão na estimativa dos parâmetros utilizados. No estudo da diversidade genética, em populações e sua distribuição no espaço, é imprescindível levar em consideração a quantidade de locos necessários para o alcance de alta precisão nas estimativas. Essa consideração permite o uso de um menor número de marcadores representativos do genoma, o que possibilita a otimização de recursos e tempo (GONÇALVES et al., 2014).

3.1 Diversidade genética

A heterozigosidade esperada (H_e) assumindo-se que a população se encontra sob equilíbrio de Hardy-Weinberg foi 0,266. O Índice de Shannon (I), calculado para população, foi 0,389. O número de alelos (N_a) e de alelos efetivos (N_e) foram, respectivamente, 1,672 e 1,470. Os parâmetros calculados e seus respectivos desvios são mostrados na Tabela 3.

Tabela 4 - Índice de diversidade em indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum* amostrados na Área Influência Direta da UHE Belo Monte, Altamira, PA.

População	N	N_a	N_e	H_e	I
Altamira	26,733 (0,271)	1,672 (0,035)	1,470 (0,029)	0,266 (0,015)	0,389 (0,0212)

N: número de indivíduos analisados, N_a : número de alelos, N_e : número de alelos efetivos, H_e : diversidade genética; I : Índice de Shannon; () Erro Padrão.

Fonte: Do autor (2016).

Liu et al. (2013) analisaram a diversidade genética, em populações da espécie ameaçada *Machilus thunbergii* (Lauraceae), utilizando oito marcadores ISSR e encontraram os valores 0,234 e 0,370 para heterozigosidade esperada e Índice de Shannon, respectivamente. Esses autores relataram que houve grande variação da diversidade genética, nas populações amostradas e as diferenças, nas condições ecológicas e ambientais, podem ser os principais fatores responsáveis por essas variações.

Zhang et al. (2012) usaram dez *primers* ISSR no estudo da diversidade genética de três espécies pertencentes à família Lauraceae. Para espécie rara e ameaçada *Phoebe chekiangensi*, a heterozigosidade esperada e o Índice de Shannon foram, respectivamente, 0,195 e 0,294. Os valores de H_e e I para a espécie com ampla distribuição geográfica e ameaçada *Phoebe bournei* foram 0,259 e 0,388, respectivamente. Já, para *Machilus pauhoi*, espécie amplamente distribuída, os valores para esses índices foram, respectivamente, 0,347 e 0,505. Os autores sugeriram que traços únicos da espécie *P. chekiangensi* restringiram

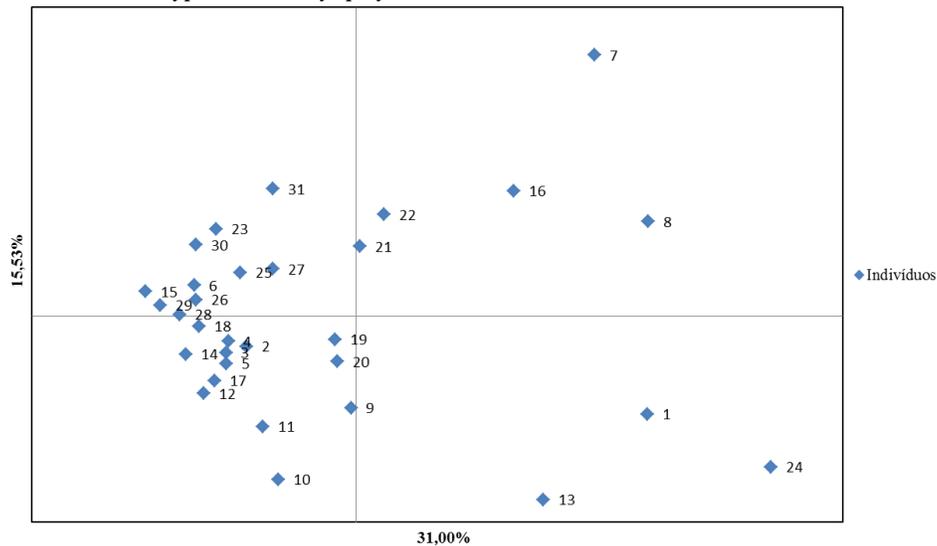
sua distribuição, o que pode ter levado ao aumento gradual nas taxas de endogamia e redução da heterozigossidade.

Como pode ser observado, a diversidade genética de *D. caryophyllaceum*, na população estudada, foi moderada ($H_e = 0,266$ e $I = 0,389$). Quando comparada com outras espécies da mesma família (TABELA 2), os valores de diversidade genética são bastante diferentes. Essa variação ocorre pelas características distintas das espécies e, também, por fatores como desmatamento e redução da área de ocorrência da espécie, entre outros. No caso de *D. caryophyllaceum*, a intensa exploração da espécie pode ter gerado isolamento dessa população e redução no tamanho efetivo populacional, tendo, como consequências, a perda de alelos e diminuição da diversidade genética. O valor de diversidade genética, para a população estudada, foi de 0,266 e a amostragem contemplou apenas indivíduos adultos. Para que seja verificado o efeito do baixo número de indivíduos presentes nessa área na diversidade genética, é necessário amostrar os regenerantes e ou as progênes. Essa investigação não foi realizada, pois não foram encontrados indivíduos regenerantes e frutos da espécie.

3.2 Análise de agrupamento dos indivíduos

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostrou que as duas primeiras coordenadas explicam 31,00% e 15,53% da divergência genética entre os indivíduos de *D. caryophyllaceum* amostrados, conforme pode ser visualizado na Figura 9. A baixa representatividade da dissimilaridade, nos eixos, pode estar relacionada ao fato da amostragem ter contemplado apenas indivíduos de uma mesma população. Este resultado sugere que a magnitude das distâncias genéticas entre os indivíduos não repercute em uma distinção em grupos entre os indivíduos da população.

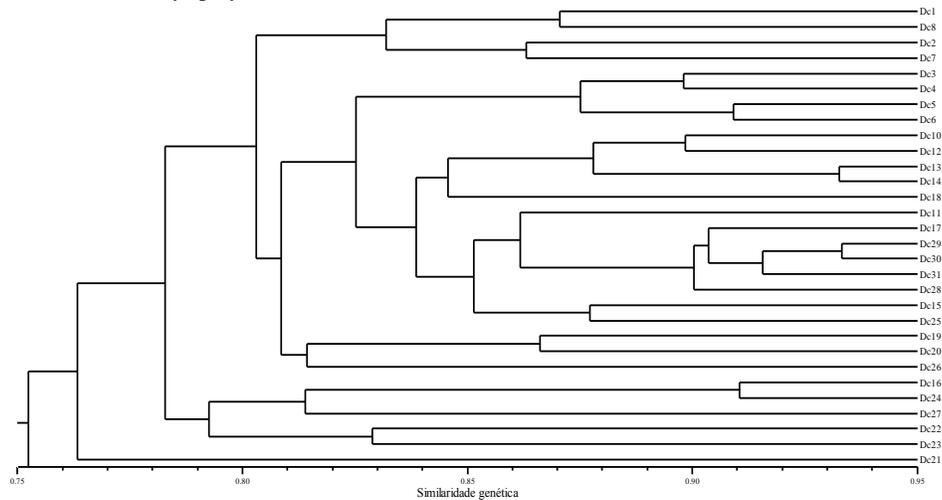
Figura 9 - Análise de Componentes Principais (PCoA) para os indivíduos de *Dicypellium caryophyllaceum* amostrados.



Fonte: Do autor (2016).

O dendrograma que representa o resultado da análise de similaridade genética entre os indivíduos de *D. caryophyllaceum* é apresentado na Figura 10. Nota-se a formação de três agrupamentos principais. O primeiro grupo envolve a maioria dos indivíduos (Dc1, Dc8, Dc2, Dc7, Dc3, Dc4, Dc5, Dc6, Dc10, Dc12, Dc13, Dc14, Dc18, Dc11, Dc17, Dc29, Dc30, Dc31, Dc28, Dc15, Dc25, Dc19, Dc20, Dc26). O segundo envolve os indivíduos Dc16, Dc24, Dc27, Dc22, Dc23 e o terceiro grupo é formado apenas pelo indivíduo Dc21. Esses três grupos identificados apresentaram uma similaridade genética de, aproximadamente, 79%. Apesar de não ser exibido no dendrograma, o indivíduo Dc9 está inserido no primeiro grupo porque sua similaridade genética com o indivíduo Dc10 é superior a 95%.

Figura 10 - Similaridade genética entre indivíduos da população de *Dicypellium caryophyllaceum*, utilizando o índice de Jaccard.



Fonte: Do autor (2016).

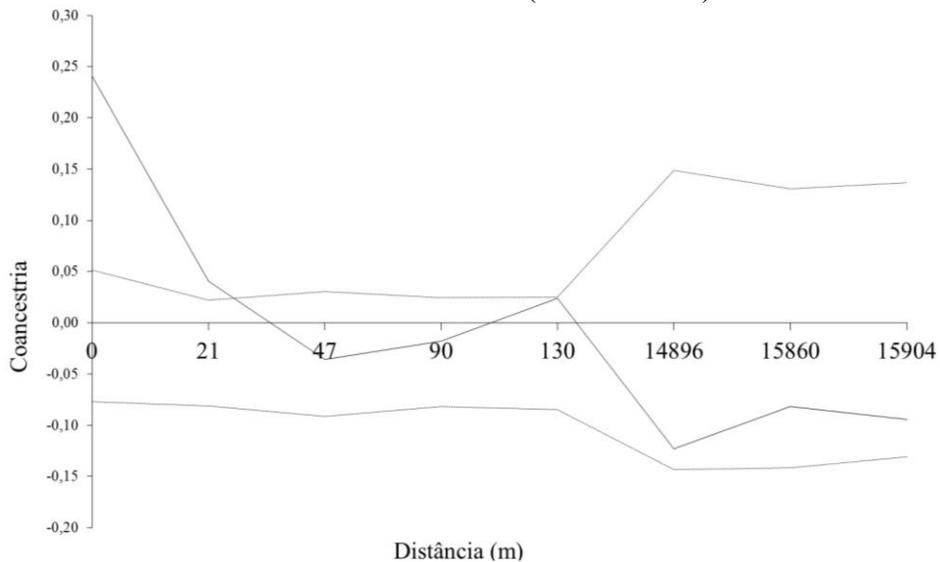
Os indivíduos Dc13 e Dc14, Dc29 e Dc30, pertencentes ao maior grupo, apresentaram similaridade genética de, aproximadamente, 93%, o que indica um parentesco muito próximo. O indivíduo Dc21 (terceiro grupo) foi o indivíduo mais distante e não se incluiu em nenhum dos agrupamentos citados. Sua similaridade genética com os demais indivíduos é de 76%.

A análise de agrupamento da similaridade genética mostrou, em um nível de 79% de similaridade genética, a divisão em três grupos dos indivíduos de *D. caryophyllaceum*. Esses agrupamentos apontam que, para a conservação *ex situ*, a amostragem deve contemplar esses grupos, uma vez que dentro deles a similaridade genética é maior e pode gerar redundância nos genótipos amostrados. A coleta de sementes, concentrada apenas em indivíduos pertencentes ao mesmo grupo, gera menor variabilidade genética, pois os indivíduos possuem elevada similaridade genética. Portanto, para a conservação *ex situ*, deve-se priorizar indivíduos pertencentes a agrupamentos distintos.

3.3 Estrutura genética espacial

A análise da estrutura genética espacial realizada, com base no coeficiente *kinship* de coancestria (HARDY, 2003), mostrou significância ($p < 0,05$) na população de *D. caryophyllaceum* estudada. Conforme mostra a Figura 10, há estruturação genética espacial com valores significativos de coancestria ($F_{ij} = 0,041$; $P = 0,019$) até a segunda classe de distância. O correlograma (FIGURA 11) indica a ocorrência de distribuição agregada dos genótipos, na área amostrada, possivelmente, pelo baixo fluxo gênico, o que potencializa o cruzamento entre indivíduos aparentados. A estruturação familiar foi observada para os indivíduos da população distanciados até 21 m (FIGURA 11).

Figura 11 - Autocorrelograma de estrutura genética espacial da população de *Dicypellium caryophyllaceum* localizada em Altamira (PA). O eixo X indica distância em metros e o eixo Y refere-se à estimativa do coeficiente médio de coancestria (linha contínua).



Fonte: Do autor (2016).

Estrutura genética espacial tem sido observada, em vários estudos, utilizando ISSR, para as diferentes espécies arbóreas como *Erythrina velutina* (GONÇALVES et al., 2014), *Myrcia splendens* (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011), *Cavanilleisa arborea* (MELO JÚNIOR et al., 2015) e outros tipos de marcadores, para as espécies *Myracrodruon urundeuva* (MORAES; KAGEYAMA; SEBBENN, 2005), *Dimorphandra mollis* (GONÇALVES et al., 2010) e *Bertholletia excelsa* (SUJII et al., 2015). Nesses estudos, a estrutura genética espacial foi relacionada a diversos fatores, principalmente, à exploração, redução do tamanho populacional.

A estrutura genética espacial (EGE) consiste na distribuição não aleatória dos genótipos que ocorre pela ação de diferentes processos, como eventos históricos e pressão de seleção (VEKEMANS; HARDY, 2004). A drástica redução populacional, decorrente da exploração sofrida por *D. caryophyllaceum*, pode ser a principal causa da ocorrência de estrutura genética espacial na população estudada. Dessa forma, nas coletas de sementes, para propagação e conservação *ex situ* da espécie, recomenda-se respeitar uma distância mínima de 21 m na amostragem. Além do distanciamento entre indivíduos a serem amostrados, para programas de conservação *ex situ*, o respeito a essa distância possibilita a obtenção de maior variabilidade genética.

3.4 Gargalo genético

O teste de Wilcoxon, para ocorrência de gargalo genético, apresentou resultado significativo ($P = 0,03125$) para o Modelo do Alelo Infinito. Isso indica que a população estudada de *D. caryophyllaceum* passou por uma redução recente no tamanho da população e apresentou significativo excesso de heterozigosidade (CORNUET; LUIKART, 1996).

A ocorrência de gargalo genético, também, foi relatada por Lee et al. (2002), em populações de *Intsia palembanica*, por Álvares-Carvalho et al. (2015), em populações de *Schinus terebinthifolius* e por Vieira e Carvalho (2008), em estudo sobre a espécie *Protium spruceanum*. Nesses três estudos, o Modelo do Alelo Infinito (KIMURA; CROW, 1964), também, mostrou-se o modelo mais adequado.

O gargalo genético ocorre em populações cujo tamanho populacional efetivo foi drasticamente reduzido, como ocorreu com *D. caryophyllaceum* na área estudada. Essa redução leva a um desequilíbrio nas taxas de mutação e deriva genética que ocorre por uma correlativa e progressiva redução no número de alelos e na heterozigosidade (CORNUET; LUIKART, 1996).

A identificação da ocorrência de gargalo genético, em populações, evidencia a ocorrência histórica de processos de fragmentação (VIEIRA; CARVALHO, 2008). Isso permite a inferência do risco de extinção local dessas populações por não estarem adaptadas às perturbações geradas por seus reduzidos tamanhos populacionais (LEE et al., 2002). Os efeitos prejudiciais da ocorrência de gargalo genético podem ser evitados ou minimizados pela introdução de novos indivíduos (VIEIRA; CARVALHO, 2008).

3.5 Considerações para conservação genética

O uso de *primers* ISSR se mostrou eficiente no estudo da diversidade genética de *D. caryophyllaceum*. A análise de suficiência de bandas mostrou que em se adotando um número mínimo de 82 fragmentos poderiam ser obtidos, com precisão, os parâmetros genéticos para população analisada.

Tratando-se de uma espécie endêmica e ameaçada de extinção, os resultados encontrados, para diversidade genética ($H_e = 0,266$ e $I = 0,389$), foram moderados. Para o aumento da diversidade genética na população

estudada, recomenda-se a inserção de novos indivíduos (respeitando-se a baixa densidade natural da espécie) e aumento no fluxo gênico com populações adjacentes pela criação de corredores de vegetação. A inserção de novos indivíduos pode ser realizada com o plantio de mudas, resgate de plântulas (de áreas que serão suprimidas, por exemplo) e semeadura direta.

A análise de agrupamento mostrou, em um nível de 79% de similaridade genética, a divisão dos indivíduos amostrados em três grupos. Isso mostra que a amostragem de sementes, para propagação da espécie, deve contemplar esses grupos uma vez que dentro deles a similaridade genética é maior e pode gerar redundância nos genótipos amostrados.

A ocorrência de estrutura genética espacial mostrou que os indivíduos distanciados entre si a 21 m possuem alto grau de parentesco. A coleta de sementes para propagação deve respeitar essa distância mínima entre indivíduos para evitar a ocorrência de endogamia.

Neste estudo, foi observado que a população passou por uma recente redução no tamanho populacional (gargalo genético). É importante a avaliação genética, recorrente das progênies e regenerantes, para verificação dos efeitos do gargalo genético nas futuras gerações. A inserção de novos indivíduos é uma alternativa que pode minimizar esse problema.

O conhecimento da diversidade genética de *D. caryophyllaceum* e sua distribuição no tempo e espaço são imprescindíveis para elaboração de planos eficientes na conservação da espécie *in situ* e *ex situ*. Como são incipientes os estudos sobre essa espécie, pesquisas sobre a ecologia da espécie, biologia reprodutiva, fenologia e propagação, também, podem contribuir, significativamente, para sua conservação.

4. CONCLUSÕES

A diversidade genética para *D. caryophyllaceum* foi de 0,266 e o índice de Shannon de 0,389.

A análise de agrupamento da similaridade genética mostrou, em um nível de 79% de similaridade genética, a divisão dos indivíduos amostrados em três grupos distintos de genótipos.

Foi detectada estrutura genética espacial dos indivíduos distanciados entre si a 21 m.

A população de *D. caryophyllaceum* passou por uma recente redução no tamanho populacional (gargalo genético).

REFERÊNCIAS

- ÁLVARES-CARVALHO, S. V. et al. *Schinus terebinthifolius*: populations structure and implications for its conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 58, p. 120-125, Feb. 2015.
- BERCHIN, I. I. et al. Energy production and sustainability: a study of Belo Monte hydroelectric power plant. **Natural Resources Forum**, Hoboken, v. 39, n. 3/4, p. 224-237, Aug./Nov. 2015.
- BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética e filogeografia de *Ceiba pubiflora* (A.St.-Hil.) K. Schum. (Malvaceae)**. 2012. 115 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. de A.; CARVALHO, D. de. Estrutura genética em microescala especial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 957-964, set./out. 2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 set. 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf>. Acesso em: 19 maio 2016.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, Dec. 1996.
- CRUZ, C. D. Genes: software for experimental statistics in genetics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, p. 135-138, 1998.
- DUARTE, J. F.; CARVALHO, D. de; VIEIRA, F. de A. Genetic conservation of *Ficus bonijesulapensis* R. M. Castro in a dry forest on limestone outcrops. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 59, p. 54-62, Apr. 2015.
- ELETROBRÁS; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Relatório de impacto ambiental: aproveitamento hidrelétrico Belo Monte**. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://norteenergiasa.com.br/site/wp-content/uploads/2011/04/NE.Rima_.pdf>. Acesso em: 17 maio 2016.

- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanco energético nacional**. 2015. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2015.pdf>. Acesso em: 17 maio 2016.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 326, p. S22-S29, Aug. 2003.
- GONÇALVES, A. C. et al. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 325-332, abr./jun. 2010.
- GONÇALVES, L. O. et al. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 290-298, jun. 2014.
- HARDY, O. J. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation by distance processes using dominant genetic markers. **Molecular Ecology**, Malden, v. 12, n. 6, p. 1577-1588, June 2003.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 618-620, 2002.
- HU, Z. Y. et al. Genetic diversity and differentiation among populations of *Bretschneidera sinensis* (Bretschneideraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 56, p. 104-110, Oct. 2014.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **The IUCN red list of threatened species**. Version 2015-4. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 11 maio 2016.
- IVANAUSKAS, N. M.; MONTEIRO, R.; RODRIGUES, R. R. Classificação fitogeográfica das florestas do Alto Rio Xingu. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 3, p. 387-402, 2008.
- KARRON, J. D. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (Ed.). **Genetics and**

conservation of rare plants. New York: Oxford University Press, 1991. p. 87-98.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, Baltimore, v. 49, n. 4, p. 725-738, 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 75, n. 6, p. 2868-2872, 1978.

LEE, S. L. et al. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of virgin jungle reserves in peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 89, n. 3, p. 447-459, Mar. 2002.

LEMOS, D. A. N. et al. Floristic and phytosociology in dense “terra firme” rainforest in the Belo Monte Hydroelectric Plant influence area, Pará, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 3, p. S257-S276, Aug. 2015.

LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2016.
Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB17928>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

LIU, J. et al. Genetic diversity of natural populations of *Machilus thunbergii*, an endangered tree species in eastern China, determined with ISSR analysis. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 3689-3697, 2013.

LOPES, S. de F. et al. Landscape changes and habitat fragmentation associated with hydroelectric plants reservoirs: insights and perspectives from a Central Brazilian case history. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 4, p. 1205-1212, July/Aug. 2014.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. D. (Org.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: A. Jakobsson; Instituto de Pesquisas “Jardim Botânico do Rio de Janeiro”, 2013. 1100 p.

MELO JÚNIOR, A. F. et al. Spatial genetic structure of *Cavanillesia arborea* K. Schum. (Malvaceae) in seasonally dry Tropical forest: implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 58, p. 114-119, Feb. 2015.

MOGG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 666-668, Dec. 2003.

MORAES, M. L. T. de; 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, MG, v. 29, n. 2, p. 281-289, abr. 2005.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 87, n. 3, p. 583-590, July 1978.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1143-1155, May 2004.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. Genalex 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 6, n. 1, p. 288-295, Mar. 2006.

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

ROHLF, F. J. **Ntsys-Pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter, 2000. 38 p.

SALOMÃO, R. de P.; ROSA, N. de A. Pau-cravo: 'droga do sertão' em risco de extinção. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 289, p. 46-50, jan./fev. 2012.

SOUSA JUNIOR, W. C. de; REID, J. Uncertainties in Amazon hydropower development: risk scenarios and environmental issues around the Belo Monte dam. **Water Alternatives**, Washington, v. 3, n. 2, p. 249-268, June 2010.

SUJII, P. S. et al. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 955-964, Aug. 2015.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analysis in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 921-935, Apr. 2004.

VIEIRA, F. de A.; CARVALHO, D. de. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 17, n. 10, p. 2305-2321, Sept. 2008.

WU, F. Q. et al. Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world's largest Rhododendron. **AOB Plants**, Oxford, v. 7, n. 82, p. 1-9, 2015.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J. **Popgene**. Version 1.21. Alberta: University of Alberta, 1997. Software Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis University of Alberta, Canada.

ZHANG, R. et al. Genetic diversity and differentiation within three species of the family Lauraceae in southeast China. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 44, p. 317-324, Oct. 2012.

ZHOU, T. H. et al. Genetic diversity of the threatened Chinese endemic plant, *Sinowilsonia henryi* Hensi. (Hamamelidaceae), revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 56, p. 171-177, Oct. 2014.

ZOGHBI, M. G. B.; SALOMÃO, R. P.; GUILHON, G. M. S. P. Leaf essential oils of *Dicypellyum caryophyllaceum* (Mart.) Ness (Lauraceae): an almost extinct species in the Amazon. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, New Delhi, v. 1, n. 2, p. 19-21, 2013.