

JULIANA DE FREITAS ENCINAS DARDENGO

**DIVERSIDADE GENÉTICA, DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E ANATOMIA FOLIAR DE *Theobroma*
L. EM POPULAÇÃO NATURAL NO NORTE DO
ESTADO DE MATO GROSSO**

Dissertação de Mestrado

ALTA FLORESTA-MT

2014



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO

**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS
AMAZÔNICOS**



JULIANA DE FREITAS ENCINAS DARDENGO

**DIVERSIDADE GENÉTICA, DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E ANATOMIA FOLIAR DE *Theobroma*
L. EM POPULAÇÃO NATURAL NO NORTE DO
ESTADO DE MATO GROSSO**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi
Co-orientadora: Profa. Dra. Ivone Vieira da Silva

ALTA FLORESTA-MT

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO, CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação

Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Roberta Maria Miranda Caetano – CRB 1/2914

D216d DARDENGO, Juliana de Freitas Encinas
Diversidade genética, distribuição espacial e anatomia foliar de *Theobroma* L. em população natural no norte do estado de Mato Grosso / Juliana de Freitas Encinas Dardengo. Alta Floresta-MT, 2014.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos. Área de Concentração: Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos) – Universidade do Estado de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias.
Orientação: Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi
Co-orientação: Dra. Ivone Vieira da Silva
1.Conservação. 2.Variabilidade genética. 3.Amazônia. I. Título.

CDD 333.75

**DIVERSIDADE GENÉTICA, DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E ANATOMIA FOLIAR DE *Theobroma*
L. EM POPULAÇÃO NATURAL NO NORTE DO
ESTADO DE MATO GROSSO**

Juliana de Freitas Encinas Dardengo

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Aprovada em: 21/01/2014

Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi
Orientadora – UNEMAT/ PPGBioAgro

Prof. Dr. Oscar Mitsuo Yamashita
UNEMAT/ PPGBioAgro

Profa. Dra. Magali Gonçalves Garcia
UFPA

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Lucas, com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado durante esses anos ensinando-me a acertar o caminho, abençoando-me sempre, fortalecendo-me nos momentos de dificuldade, consolando-me nos momentos de tristeza e proporcionando-me momentos de alegria como este. Obrigada Senhor!

A Universidade do Estado de Mato Grosso e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos pelo acolhimento e qualificação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão à bolsa de estudos.

A Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi, pela orientação e ensinamentos recebidos, pelo incentivo e compreensão em todos os momentos.

Aos professores do programa de Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos pelo conhecimento compartilhado, principalmente Profa. Dra. Ivone Vieira da Silva pela coorientação e amizade.

Aos meus pais, Luiz Antônio e Tânia, por me oportunizarem a vida e me ensinarem a vivê-la com dignidade, pelo incentivo e confiança em todos os momentos.

Ao meu esposo Lucas, pelo companheirismo, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos. Por ter me acompanhado e acreditado que eu seria capaz de concluir mais esta etapa.

A toda minha família que mesmo distante compartilha comigo o sabor das pequenas conquistas e me incentiva a continuar a caminhada, saibam que nada seria possível sem o apoio de vocês.

Aos colegas de laboratório e da Pós Graduação pelo apoio nas rotinas e pelo companheirismo, especialmente Cleverson Rodrigues e Bruna Mezzalira.

“Se a educação sozinha não pode transformar a sociedade, tampouco sem ela a sociedade muda.”

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SIGLAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.1. A floresta Amazônica.....	01
1.2. Características do cacauí (<i>Theobroma speciosum</i>) e cupuí (<i>Theobroma subincanum</i>)	01
1.3. Diversidade genética	02
1.4. Estrutura Genética Espacial	02
1.5. Marcadores Microsatélites (SSR)	02
1.6. Anatomia foliar	04
1.7. Estrutura e Distribuição Espacial.....	04
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	06
3. CAPÍTULOS.....	08
3.1. DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DE <i>Theobroma speciosum</i> Willd ex Spreng. EM UMA POPULAÇÃO NATURAL DO PARQUE NACIONAL DO JURUENA – MT	08
Resumo.....	09
Abstract.....	09
Introdução	10

Material e Métodos.....	12
Resultados e Discussão.....	17
Conclusões.....	26
Referências Bibliográficas.....	27
3.2. ESTRUTURA ESPACIAL DE <i>Theobroma subincanum</i> Mart. E <i>Theobroma speciosum</i> Willd. ex Spreng. NO PARQUE NACIONAL DO JURUENA, MATO GROSSO	33
Resumo.....	34
Abstract.....	34
Introdução	36
Material e Métodos.....	39
Resultados	43
Discussão.....	46
Conclusões.....	50
Referências Bibliográficas.....	51
3.3. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA LUMINOSA NOS ASPECTOS ANATÔMICOS DE FOLHAS DE <i>Theobroma speciosum</i> Willd ex Spreng. (MALVACEAE) VISANDO DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO	54
Resumo.....	55
Abstract.....	55
Introdução	57
Material e Métodos.....	60
Resultados e Discussão.....	62

Conclusões.....	69
Referências Bibliográficas.....	70
4. CONCLUSÕES GERAIS	73

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
CAPÍTULO 1	
1. Características de 05 <i>primers</i> SSR isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) selecionados para o estudo da diversidade genética em uma população natural de <i>T. speciosum</i>	14
Diversidade genética e endogamia em locos microssatélites de árvores adultas e subadultas de <i>Theobroma speciosum</i>	20
CAPÍTULO 2	
1. Média e erro padrão da Densidade (ind. ha ⁻¹), área basal (m ² .ha ⁻¹), diâmetro (cm) e altura total (m) de <i>T. speciosum</i> e <i>T. subincanum</i> no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso	43
2. Demonstração dos valores encontrados no cálculo de distribuição espacial de <i>T. speciosum</i> e <i>T. subincanum</i> no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso	45
CAPÍTULO 3	
1. Espessura da nervura central (NC), feixe vascular (FV), mesofilo (MS), parênquima paliádico (PP) e parênquima lacunoso (PL), em folhas de <i>T. speciosum</i> de pastagem (P) e de floresta ombrófila densa (F)	64
2. Contribuição relativa das cinco características quantitativas avaliadas para a divergência anatômica foliar em 10 indivíduos de <i>T. speciosum</i>	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
CAPÍTULO 1	
1. Localização geográfica das subparcelas em estudo no Parque Nacional do Juruena.....	13
2. Distograma para a Distância Genética de Gregorius por classes de distância entre árvores em uma população de <i>Theobroma speciosum</i>	21
3. Correlograma plotando o coeficiente de coancestria em diferentes classes de distância entre árvores em uma população de <i>Theobroma speciosum</i>	22
CAPÍTULO 2	
1. Localização geográfica das parcelas em estudo no Parque Nacional do Juruena.....	40
2. Distribuição diamétrica de <i>T. speciosum</i> e <i>T. subincanum</i> no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso.....	44
3. Relação hipsométrica de <i>T. speciosum</i> e <i>T. subincanum</i> no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso.....	44
CAPÍTULO 3	
1. Secções transversais do limbo foliar de <i>T. speciosum</i>	63
2. Secções transversais da folha de <i>T. speciosum</i>	65
3. Dendrograma representativo do padrão de dissimilaridade entre os 10 indivíduos de <i>T. speciosum</i> , obtido pelo Método de Agrupamento de ligação Média entre Grupos (UPGMA) com base na Distância Euclidiana Média padronizada, estimada a partir de 05 características anatômicas quantitativas.....	66

LISTA DE SIGLAS

CAP Circunferência à altura do peito

CTAB Brometo de cetil trimetil amônio

DAP Diâmetro à altura do peito

DNA Ácido Desoxirribonucléico

FAA Formalina, Álcool etílico e Ácido acético

GL Gay Lussac

GPS Sistema de Posicionamento Global

ICMBio Instituto Chico Mendes de Biodiversidade

MT Mato Grosso

Pb Pares de Base

PCR Reações em cadeia da Polimerase

PNJu Parque Nacional do Juruena

SSR Sequências Simples Repetidas

UC Unidade de Conservação

UNEMAT Universidade do Estado de Mato Grosso

UPGMA Método da média ponderada

UTM Universal Transverso de Mercator

RESUMO

DARDENGO, Juliana de Freitas Encinas. M.Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso, Janeiro de 2014. **Diversidade genética, distribuição espacial e anatomia foliar de *Theobroma* L. em população natural no norte do estado de Mato Grosso.** Orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi. Co-orientadora: Ivone Vieira da Silva.

A análise dos padrões de distribuição espacial e genético e o conhecimento anatômico de uma espécie são ferramentas muito utilizadas para entender seu comportamento ecológico, pois embasam estratégias de manejo e influenciam na estrutura populacional. O presente estudo objetivou estudar a estrutura horizontal das espécies *Theobroma speciosum* (cacauí) e *Theobroma subincanum* (cupuí) e também caracterizar a diversidade genética e a anatomia foliar de *T. speciosum*, registrando as diferenças estruturais observadas entre folhas de sol e folhas de sombra. A diversidade genética detectada encontra-se espacialmente estruturada dentro da população, sendo que quanto mais próximas as árvores, maior é a probabilidade de serem aparentadas. Em relação à distribuição espacial, *T. speciosum* apresentou padrão de distribuição agregado, enquanto *T. subincanum* padrão aleatório. A distribuição diamétrica de *T. speciosum* seguiu uma distribuição em forma de “J” invertido, comportamento esperado para um ambiente florestal com pouca pressão antrópica. Já *T. subincanum* não seguiu o mesmo padrão, entretanto as espécies demonstraram estar bem estabelecidas na área, com número de indivíduos significativo em todas as classes diamétricas. A constituição do mesofilo nas folhas de sol e sombra de *T. speciosum* variou com o ambiente. Plantas expostas a pleno sol apresentaram células mais alongadas no parênquima paliçádico, parênquima lacunoso com mais camadas e maior quantidade de tricomas nas folhas, enquanto que as folhas de sombra apresentaram células com muitos espaços intercelulares no mesofilo. Foram observadas alterações anatômicas significativas ocasionadas pelas variações da intensidade luminosa sobre as folhas, o que evidenciou grande capacidade adaptativa de *T. speciosum*. Assim, os resultados apontam a importância de áreas de conservação como forma instituída para salvaguardar ambientes naturais das pressões exercidas por diferentes ações antrópicas e também a necessidade de estudos na região do bioma amazônico.

Palavras-chave: Conservação, Variabilidade Genética, Amazônia.

ABSTRACT

DARDENGO, Juliana de Freitas Encinas. M.S. Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014 January. **Genetic diversity, spacial distribution and leave anatomy of *Theobroma* L. natural population in the northern of Mato Grosso state.** Adviser: Ana Aparecida Bandini Rossi. Co-adviser: Ivone Vieira da Silva.

The spatial and genetic distribution analysis and the anatomical knowledge of a species is a very useful tool to understand your ecological behavior because it provides information that underlie management strategies and influence the population structure. The present study aimed to study the horizontal structure of the species *Theobroma speciosum* (cacaui) and *Theobroma subincanum* (cupui) and also characterize the genetic diversity and anatomy of leaves of *T. speciosum*, recording the structural differences observed between sun leaves and shade leaves. The genetic diversity detected was spatially structured within the population, and that the closer the trees, more is the probability of being closely related. In relation to spatial distribution, the *T. speciosum* individuals showed aggregated distribution pattern, while *T. subincanum* presented a random pattern. The diameter distribution of *T. speciosum* followed a distribution in the form of inverted "J", behavior expected for a forest environment with low anthropic pressure, as *T. subincanum* not followed the same pattern, however the species proved to be well established in the area, with a significant number of individuals in all diameter classes. The constitution of the sun and shade leaves of *T. speciosum* mesophyll varied with the environment. Plants exposed to full sunlight showed longer cells in the palisade parenchyma, spongy parenchyma also showed many layers of overlapping cells, whereas shade leaves showed cells with many intercellular spaces. Were observed significant anatomical changes caused by variations of light intensity on the leaves, which revealed a large adaptive capacity of *T. speciosum*. Thus, the results indicate the importance of conservation areas established in order to safeguard the natural environment from the pressures of different anthropic actions, and also the need for studies in the region of the Amazon biome.

Key-words: Conservation, Genetic Variability, Amazonia.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A Floresta Amazônica

A Floresta Amazônica localiza-se ao norte da América do Sul e possui cerca de 6,5 milhões de km². Destes, cerca de 85% encontra-se em território brasileiro e os 15% restantes entre Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela (SIVAM, 2012). O clima é equatorial quente e úmido, com temperatura variando pouco durante todo o ano. A distribuição das chuvas é bastante irregular, sendo em média de 2300 mm anuais (FISCH et al., 1998).

A Amazônia possui uma heterogeneidade de habitats, solos e micro climas que a caracterizam como um ambiente formado por mosaicos distintos e interdependentes, que provavelmente são os responsáveis por esta floresta conter a maior biodiversidade do planeta (RIBEIRO et al., 1999).

Quanto à biodiversidade amazônica, é evidente e preocupante o fato de que o ritmo de perda do patrimônio biológico promovido, principalmente, pelo desmatamento e a ocupação agrícola realizada de modo inadequado é muito maior que o do processo de inventário. Assim, a necessidade de estratégias para a conservação da biodiversidade, aliada as pressões mundiais por tecnologias menos agressivas ao ambiente, tornou prioridade a pesquisa sobre recursos genéticos.

1.2. Características do cacauí (*Theobroma speciosum*) e cupuí (*Theobroma subincanum*)

Tanto o cacauí quanto o cupuí são nativos de toda região Amazônica e ocorrem preferencialmente em mata primária de terra firme não inundável. Seus frutos são comestíveis e com as sementes (amêndoas) prepara-se um chocolate de qualidade. Entre as espécies do gênero, o cacauí é a que possui o teor de gordura mais parecido com o cacau, ou seja, um sucedâneo potencial (SILVA et al., 2004). O cupuí também representa um grande potencial econômico para a região, apesar de seu potencial, esta espécie ainda continua pouco relacionada a estudos que viabilizem o manejo de suas populações.

O cacauí e o cupuí apresentam árvores de porte mediano, entretanto, a copa do cacauí é estreita e rala e seu fruto apresenta casca levemente aveludada (LORENZI, 2000), enquanto o cupuí apresenta copa

multirramificada e fruto com pericarpo duro e resistente, recoberto por um indumento semelhante ao do cupuaçu verdadeiro (CAVALCANTE, 1991).

1.3. Diversidade Genética

Conhecer os padrões de variabilidade genética entre e dentro de populações é um valioso instrumento que poderá ajudar na adoção de práticas mais eficientes, no tocante à conservação, podendo servir de base para técnicas de manejo adequado de fragmentos e fornecer subsídios para medidas de conservação *in situ* (RENAU-MORATA et al., 2005).

Os estudos moleculares sobre diversidade genética facilitam a identificação de variações genéticas não representadas nas coleções e o melhor direcionamento no uso do material, em programas de melhoramento genético (LIMA et al., 2003).

Espécies que apresentam valores baixos de diversidade genética podem ter reduzida capacidade de sobreviver a doenças e não se adaptarem a mudanças ambientais. Assim, a diversidade genética pode ser considerada de fundamental importância para a sustentabilidade e estabilidade dos ecossistemas (RAJORA & PLUHAR, 2003).

1.4. Estrutura genética espacial

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

O reconhecimento da existência de certo nível de estruturação genética espacial em populações auxilia no estabelecimento de medidas de conservação genética, indicando formas de maximizar a diversidade genética na coleta de sementes para programas de conservação *ex situ*, melhoramento genético, recuperação de áreas degradadas, bem como inferir sobre tamanhos mínimos de área para a sua conservação *in situ*. (GUSSON et al., 2005).

1.5. Marcadores Microssatélites (SSR)

Estudos genéticos em populações naturais de espécies arbóreas tropicais por marcadores moleculares tiveram início na Malásia, com grande avanço nas florestas neotropicais no Panamá, Costa Rica e no Brasil

(KAGEYAMA et al., 2003). Por marcador molecular, define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de gene expresso. É uma característica capaz de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos (VIANA et al., 2003).

Assim, pode-se considerar como marcador genético, toda característica fenotípica ou qualquer segmento de DNA que sejam transmitidos pelos pais para as progênes e que permitam a análise de similaridade e diversidade genética entre indivíduos. As diferenças na sequência gênica podem ser diretamente observadas e descritas com alto grau de precisão. Os marcadores moleculares são utilizados no estudo da extensão e distribuição da variação entre espécies como também para investigar questões taxonômicas e evolutivas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da DNA polimerase) na década de 80, novos tipos marcadores foram desenvolvidos, por meio da PCR. Amplificando-se porções específicas do genoma, desde que as sequências adjacentes sejam conhecidas. Com base na técnica de PCR, foi possível desenvolver várias metodologias para detectar marcadores moleculares de DNA, dentre os quais os marcadores microssatélites (*SSR - Simple Sequence Repeats* - Sequências simples repetidas) (VIANA et al., 2003).

Segundo Gaiotto et al. (2003), os marcadores de microssatélites são altamente informativos e discriminantes. Eles têm sido utilizados em estudos de populações naturais por serem: multialélicos, altamente polimórficos, codominantes, abundantes, uniformemente distribuídos no genoma e facilmente obtidos em ensaios de PCR.

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

1.6. Anatomia Foliar

A plasticidade fenotípica é a capacidade que alguns genótipos possuem de responder a alterações do meio ambiente em que se encontram, modificando a sua expressão fenotípica, mediante ajustamentos morfológicos ou fisiológicos (SCHLICHTING, 1986).

Isso ocorre quando espécies típicas de sub-bosque apresentam ocorrência em locais com elevada incidência luminosa, como pastagens. Em se tratando de intensidade luminosa é importante levar em consideração as variações na estrutura foliar, pois, este é o órgão da planta que mais responde anatomicamente às variações luminosas de um determinado habitat (DICKISON, 2000).

Esse é um dos maiores interesses da plasticidade, o fato de poder incluir também processos ativos de adaptação ao stress ambiental, um aspecto fundamental para garantir a estabilidade das populações perante as alterações globais do clima, especialmente importante no caso das árvores, que são organismos de grande longevidade, associada a uma reprodução tardia e incapazes de se deslocarem para zonas de clima mais favorável (SULTAN 2000).

As condições do solo, da água, da luz e da temperatura, influenciam no desenvolvimento e produtividade das plantas, muitas plantas expostas à alta intensidade luminosa, por mutações adquirem mecanismos morfológicos e fisiológicos que possibilitam sua sobrevivência (SILVA et al., 2005). Esses mecanismos compreendem, na folha principalmente, a redução do tamanho, capacidade de enrolamento, alta densidade de tricomas, estômatos profundos, acúmulo de mucilagem e outros metabólitos secundários e aumento da compactação do mesofilo (BOSABALIDIS & KOFIDIS, 2002).

1.7. Estrutura e Distribuição Espacial

A análise dos padrões de distribuição espacial é uma ferramenta muito utilizada para entender o comportamento ecológico da espécie, pois fornece informações que embasam estratégias de manejo e influenciam na estrutura populacional (ANJOS et al., 2004). A distribuição espacial é resultante de vários fatores que interagem entre si, tais como o tipo de solo, altitude, intensidade luminosa, presença de dispersores e polinizadores (BUDKE et al., 2004).

A distribuição do número de indivíduos em classes de tamanho é outro fator que determina a estrutura populacional de uma espécie. Segundo Salomão (1995), a maioria das espécies tropicais apresenta uma distribuição balanceada, entretanto Oliveira & Amaral (2004) consideram a distribuição em “J” invertido como característica de florestas nativas com pouca ou nenhuma pressão antrópica.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, A. et al. Análise de distribuição espacial de araucária (*Araucaria augustifolia*) em algumas áreas do Estado do Pará, utilizando a função K de Ripley. **Scientia Florestalis**, v. 66, p. 38-45, 2004.

BOSABALIDIS, A. M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive Cultivars. **Plant Science**, v. 163, p. 375-379, 2002.

BUDKE, J. C. et al. Distribuição especial de *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay (Orchidaceae) em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 31-35, 2004.

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

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5.ed. Belém: CEJUP/CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. 279p.

DICKISON, W. C. **Integrative Plant Anatomy**. Burlington, USA: Academic Press. 2000.

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

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

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

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

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T.H. (Eds.). **Frugivores and Seed Dispersal**. Dordrecht: Junk Publishers, cap. 17, p. 211-223, 1986.

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

LIMA, M. R. et al. Caracterização de cultivares de pessegueiro e de nectarineira por marcadores moleculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.349-355, 2003.

LOISELLE B. A. et al. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, n. 82, p. 1420–1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 1 e 2. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2000, 220 p.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 21-34, 2004.

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

RENAU-MORATA, B. et al. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) accessed using random amplified polymorphic DNA. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 5, p. 875-884, 2005.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Análise de uma Floresta de Terra-firme na Amazônia Central**, Manaus: INPA, 1999, 816 p.

SALOMÃO R. P. et al. Estrutura populacional e breve caracterização ecológica – econômica de 108 espécies arbóreas da floresta amazônica brasileira. **Interciência**, v. 20, p 20 – 29, 1995.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasílica**, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SILVA, C. R.; VENTURIERI, G. A.; FIGUEIRA, A. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections species identification and characterization of interspecific hybrids. **Acta Botânica Brasílica**, v. 18, n. 2, p. 333-341, 2004.

SIVAM - SISTEMA DE VIGILÂNCIA DA AMAZÔNIA. **Amazônia Legal**. Disponível em <[HTTP://www.sivam.gov.br/AMAZONIA/apres1.htm](http://www.sivam.gov.br/AMAZONIA/apres1.htm)>. Acesso em: 10 jul. 2012.

VIANA, A. P. et al. Simple and canonic correlation between agronomical and fruit quality traits in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 133-140, 2003.

3. CAPÍTULOS

3.1. DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DE *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. EM UMA POPULAÇÃO NATURAL DO PARQUE NACIONAL DO JURUENA – MT

Resumo - (Diversidade e estrutura genética espacial de *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. em uma população natural do Parque Nacional do Juruena – MT). O uso da genética de populações para quantificar a diversidade de populações arbóreas tropicais aponta algumas direções para analisar o nível de conservação de determinada espécie. Com o intuito de elucidar a importância de unidades de conservação como o Parque Nacional do Juruena, foram analisadas a diversidade genética e a distribuição espacial em uma população natural de *T. speciosum* com base no polimorfismo de cinco locos microssatélites. Foram mapeados e genotipados 49 indivíduos adultos e 51 subadultos existentes na população. Os adultos apresentaram significativamente menor diversidade genética e maior endogamia ($k = 10,40 \pm 2,06$; $A_e = 10,34 \pm 2,00$; $F = 0,682 \pm 0,113$) do que os subadultos ($k = 10,60 \pm 2,33$; $A_e = 10,57 \pm 2,35$; $F = 0,569 \pm 0,172$). A diversidade genética detectada encontra-se espacialmente estruturada dentro da população, sendo que quanto mais próximas as árvores, maior é a probabilidade de serem aparentadas. O estabelecimento de unidades permanentes de conservação como o Parque Nacional do Juruena mostrou-se ser uma ferramenta valiosa para preservar a diversidade genética entre os indivíduos de populações naturais.

Palavras-chave: Cacaúí; Amazônia; Variabilidade Genética.

Abstract- (Diversity and spatial genetic structure of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng. in a natural population in the Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso state, Brazil). The use of population genetics for quantify the diversity of tropical tree populations shows some directions for analyses of conservation level in determinated species. With the aim to elucidate the importance of conservation units like Parque Nacional do Juruena, were analyzed the genetic diversity and the spatial structure of a natural population *T. speciosum* based in five microsatellites loci polymorphism. 49 adults and 51 subadults individuals were mapped and genotyped existing in the population. The adults showed significantly less genetic diversity and more inbreeding ($k = 10,40 \pm 2,06$; $A_e = 10,34 \pm 2,00$; $F = 0,682 \pm 0,113$) than the subadults ($k = 10,60 \pm 2,33$; $A_e = 10,57 \pm 2,35$; $F = 0,569 \pm 0,172$). The genetic diversity detected was spatially structured within the population, and that the closer the trees, more is the probability of being closely related. The establishment of permanent conservation units like the Parque Nacional do Juruena showed be a valuable tool to preserve genetic diversity among individuals from natural populations.

Keywords: Cacauihy; Amazonia; Genetic variability.

Introdução

Na região Amazônica encontra-se grande variedade de ambientes e potencial de recursos naturais. A falta de conhecimentos biológicos da grande maioria das espécies da flora amazônica é motivo de preocupação, em decorrência da perda destes recursos naturais, face à expansão da fronteira agrícola e à exploração irracional nesta região (RAPOSO, 2007).

Segundo Laurance & Vasconcelos (2009), os estudos disponíveis indicam que a fragmentação florestal causa uma diversidade de efeitos, alterando o tamanho e a dinâmica das populações, a composição e a dinâmica das comunidades, as interações tróficas e os processos ecossistêmicos. Nesse sentido, medidas que diminuam a taxa de desmatamento na ainda relativamente pouco fragmentada paisagem amazônica são urgentes.

Assim, com o intuito de salvaguardar espécies endêmicas da Amazônia foi criado em 2006 o Parque Nacional do Juruena, unidade de conservação de proteção integral, localizada no sudeste do Amazonas e norte de Mato Grosso, com área aproximada de 195.752.671 ha (SILVA et al., 2013).

Dentro desta Unidade de Conservação (UC), ocorre naturalmente o gênero *Theobroma* L., atualmente incluído na família Malvaceae Juss. (ALVERSON et al., 1999). No volumoso grupo de espécies do gênero com aproveitamento convencional ou mesmo com potencialidades de uso, encontra-se *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.

Segundo Ducke (1940), a espécie é importante por representar uma possível fonte de genes de resistência para as espécies mais relevantes economicamente. A casca do fruto, associada à cinza da madeira, é designada para a produção de um sabão artesanal, usado no interior da Amazônia como excelente desodorante (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). Em relação aos ácidos graxos, Gilabert-Escrivá et al. (2002) relatam que a composição é muito similar a encontrada na manteiga de cacau. Já Balée (1994) detectou seu uso alimentício pelos índios Ka'apor e Dewalt et al. (1999) pelos Tacana (Bolívia).

Segundo Kageyama (1987), o uso da genética de populações para quantificar a diversidade de populações arbóreas tropicais, aponta algumas direções importantes que visam minimizar os impactos ambientais, bem como analisar o nível de conservação de determinada população. Para estimar os parâmetros que inferem história evolutiva, estrutura populacional e diversidade

genética em populações naturais, os marcadores moleculares são uma das principais ferramentas utilizadas (SELKOE & TOONEN, 2006; SUNNUCKS, 2000).

Dentre esses marcadores, um dos mais utilizados são os marcadores microssatélites (SSR). Os marcadores microssatélites se distinguem dos demais por serem abundantes, estarem distribuídos por todo o genoma, apresentarem polimorfismo do tipo codominante, serem de natureza multialélica, necessitarem de pequenas quantidades de DNA e serem transferíveis entre espécies de um mesmo gênero (GRATTAPAGLIA, 2001).

Devido a sua alta variabilidade, esses marcadores têm sido utilizados como uma poderosa ferramenta em diversos estudos envolvendo mapeamento genético, melhoramento, análises de parentesco, sistemas de reprodução, fluxo gênico e conservação (MORGANTE & OLIVIERI 1993; CHASE et al., 1996; JARNE & LAGODA 1996; ZANE et al., 2002; ELLEGREN et al., 2004; VARSHNEY et al., 2005).

Considerando a existência de poucos estudos ecológicos e genéticos de espécies silvestres do gênero *Theobroma* e com o intuito de elucidar a importância de unidades de conservação, tais como o Parque Nacional do Juruena, foram analisadas a diversidade genética e a distribuição espacial em uma população natural de *T. speciosum* por meio de marcadores microssatélites. O estudo foi conduzido com base em um censo da população, amostrando-se árvores adultas e subadultas.

Este estudo visa responder os seguintes questionamentos: (i) o estabelecimento de unidades permanentes de conservação como Parque Nacional do Juruena têm sido o suficiente para preservar a diversidade genética entre os indivíduos de uma população natural? (ii) existem diferenças nos níveis de diversidade entre árvores adultas e subadultas? (iii) qual a distância mínima entre os indivíduos para a coleta de sementes representativa para programas de conservação? (iv) a diversidade genética apresenta-se estruturada espacialmente na população?

Material e Métodos

Área de estudo e número amostral

Para caracterização da diversidade genética de *T. speciosum*, foram amostrados 100 indivíduos em uma população natural localizada no Parque Nacional do Juruena, no norte do Estado de Mato Grosso.

O clima da região é equatorial e se caracteriza por temperaturas médias entre 24°C e 26°C e amplitude térmica anual de até 3°C. As chuvas são abundantes (mais de 2.500 mm.ano⁻¹) e regulares (PNJU, 2013).

Para este estudo foi implementada uma grade de 200 x 160m (3.2 ha.grade⁻¹), dentro da qual foram distribuídas sistematicamente 40 subparcelas contíguas de 20 x 40m (800 m²) (Figura 1). Dentro da grade foram amostrados, mapeados (georreferenciados com GPS) e medidos para o diâmetro a altura do peito (DAP - diâmetro a altura do peito medido a 1,30m do solo) 100 indivíduos arbóreos vivos da espécie que apresentaram DAP > 1 cm.

Foram coletadas amostras de tecido vegetal foliar de cada indivíduo, o material foliar foi identificado e acondicionado em sílica gel ainda em campo e posteriormente foi armazenado em freezer, a -20 °C.

Extração de DNA e análises de microssatélites

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas, usando o método de CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987), com modificações. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% com marcador de DNA λ .

Vinte e três pares de *primers* microssatélites (SSR) isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) para a espécie *T. cacao* foram testados utilizando três indivíduos de *T. speciosum* para amplificação inicial via PCR. Dos vinte e três *primers* testados, cinco foram selecionados para o estudo da diversidade genética da espécie em estudo (Tabela 1).

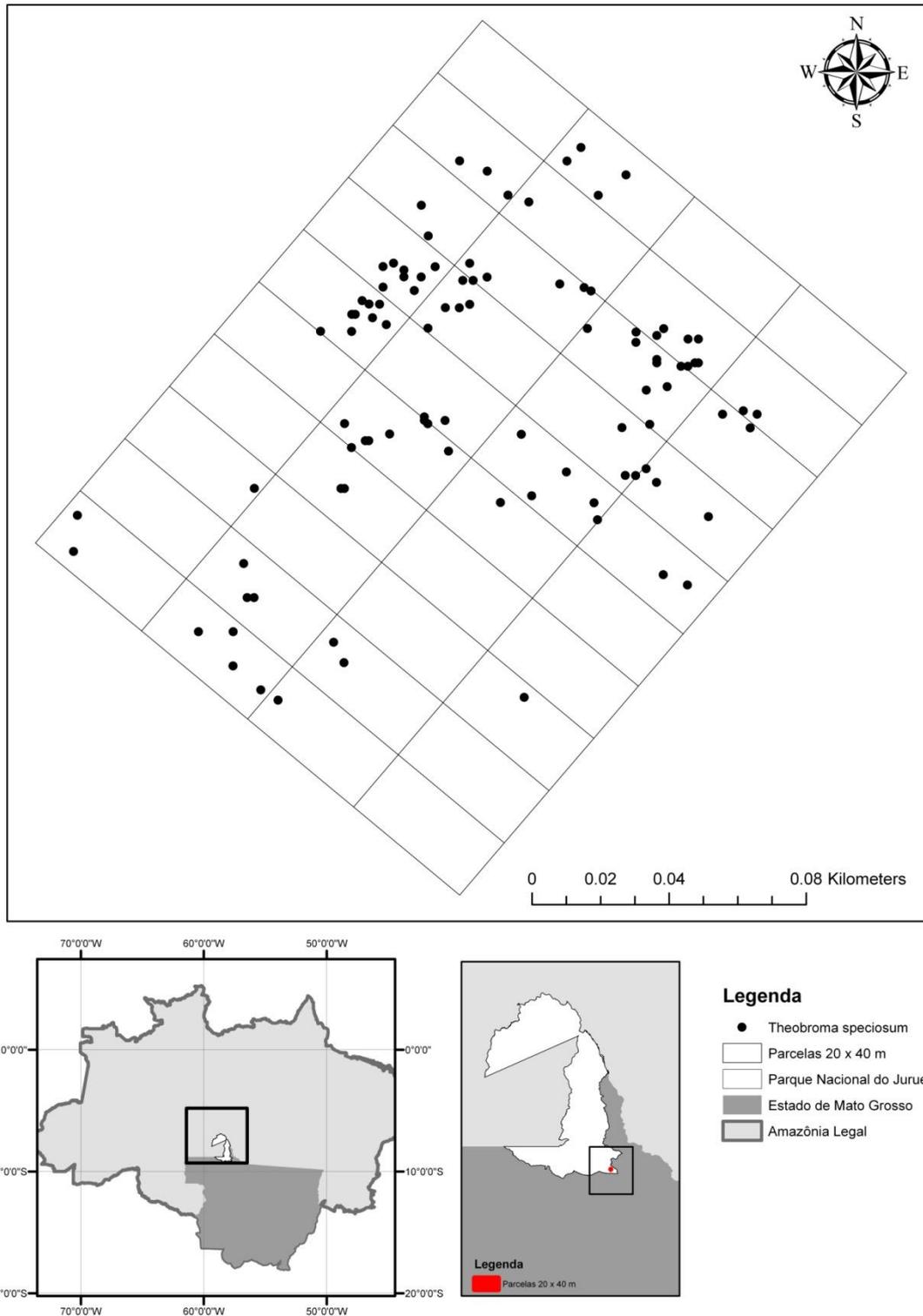


FIGURA 1. Localização geográfica das subparcelas em estudo no Parque Nacional do Juruena.

TABELA 1. Características de 05 *primers* SSR isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) selecionados para o estudo da diversidade genética em uma população natural de *T. speciosum*. T_a (Temperatura de anelamento); (pb) pares de bases.

Nome	Sequência (5'- 3')	T_a (C°)	Tamanho esperado (pb)
mTcCIR3	CATCCCAGTATCTCATCCATTCAGT CTGCTCATTTCTTTCATATCA	46	249
mTcCIR9	ACCATGCTTCCTCCTTCA ACATTTATACCCCAACCA	51	274
mTcCIR10	ACAGATGGCCTACACACT CAAGCAAGCCTCATACTC	46	208
mTcCIR17	AAGGATGAAGGATGTAAGAG CCCATACGAGCTGTGAGT	51	271
mTcCIR22	ATTCTCGCAAAAACCTTAG GATGGAAGGAGTGTAATAG	46	289

O programa de amplificação utilizado foi de acordo com o descrito por Lanaud et al. (1999), com modificações: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 46°C – 51°C (dependendo do *primer* utilizado) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% (m.v⁻¹) em tampão de corrida TBE 1X, em voltagem constante de 85 V por aproximadamente cinco horas. A coloração do gel foi feita com brometo de etídeo (0,2 mg.mL⁻¹). Em seguida o gel foi fotografado sob luz ultravioleta usando Transiluminador UVB LTB-21x26 (Loccus Biotecnologia) e posteriormente fotografado.

Os fragmentos de SSR (produtos de amplificação) foram analisados no programa GelQuant Pro para a construção de uma matriz com base no tamanho dos fragmentos das bandas encontradas nos géis.

Análise da Diversidade Genética

A diversidade genética para amostra dos adultos e subadultos (sendo classificados desta forma de acordo com o DAP que apresentaram) da

população foi caracterizada para o número total de alelos nos locos e número médio de alelos por locos (k), número efetivo de alelos nos locos e média por locos (A_e), heterozigosidade observada (H_o) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). O erro padrão da média, calculado por reamostragem jackknife entre locos para estes parâmetros foi utilizado para verificar diferenças entre as médias de adultos e subadultos.

Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação (F) de acordo com o método de Weir & Cockerham (1984). A significância estatística dos valores de F foi testada por permutação (10000). Aplicou-se também neste caso uma correção sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações para evitar falsos positivos. Todas estas análises foram realizadas com o auxílio do programa Fstat 2.9.3.2 (GOUDET, 1995).

Análise da Estrutura Genética Espacial

A caracterização da distribuição espacial dos genótipos dentro da população foi realizada a partir da distância genética de Gregorius (1978). Todos os possíveis pares de combinações de árvores foram considerados como um conjunto e foram acessados para uma das 10 classes de distância. Foram utilizadas classes de distâncias equidistantes e calculados os valores da distância genética de Gregorius (1978) para cada uma dessas classes. A distância entre multilocos mensurada através de D_{Gm} entre dois genótipos i e j é definido como:

$$0 \leq D_{Gm} = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M D_G(i, j) \leq 1$$

Em que M representa o número de locos, D_{Gm} é a média aritmética do valor D_G (GREGORIUS, 1978) de cada loco.

A distância genética média D_G entre todos os pares i e j de genótipos multilocos pertencentes a uma dada classe de distância espacial s_q serve como ferramenta para mensurar a estrutura genética espacial. O valor médio, entre todos os pares, constitui um valor de referência contra qual a estrutura genética espacial é medida. Distâncias abaixo do valor de referência indicam uma estrutura espacial positiva, em que indivíduos próximos são mais similares geneticamente do que o esperado para uma distribuição espacial aleatória dos genótipos (estrutura positiva), e distâncias acima da referência indicam estrutura negativa, em que indivíduos próximos demonstram maior divergência

genética do que o esperado para uma distribuição espacial aleatória dos genótipos.

Para o cálculo da D_G entre dois indivíduos, os dados de cada genótipo foram codificados para suas frequências alélicas, ou seja, quando o genótipo era homocigoto para o alelo sob análise, atribuiu-se o valor 1,0, quando heterocigoto atribuiu-se valor 0,5 e quando o alelo estava ausente o valor 0,0.

Um procedimento de permutações usando 1000 simulações de Monte-Carlo foi utilizado para testar a significância do desvio da distribuição espacial aleatória de cada medida calculada (MANLY, 1991). As análises de distribuição espacial e os respectivos intervalos de confiança a 95% foram obtidos através do programa SGS (DEGEN, 2003).

O coeficiente de coancestria (θ_{xy}) entre pares de árvores foi estimado para cada uma das 10 classes de distância pré-estabelecidas, usando o estimador do coeficiente de coancestria proposto por Loiselle et al. (1995):

$$\hat{\theta}_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^k (p_i - \bar{p}_k)(p_j - \bar{p}_k)}{\sum_{k=1}^K \bar{p}_k (1 - \bar{p}_k)} + \frac{1}{(2n - 1)}$$

Em que, p_i e p_j são as frequências do alelo k nos indivíduos i e j , p_k é a média da frequência dos alelos na população parental e n é o tamanho amostral. O intervalo de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente médio de coancestria estimado, para cada classe de distância, foi construído com base no erro padrão da média das estimativas, obtido por reamostragem *jackknife* entre locos. O coeficiente de coancestria e o erro padrão foram estimados usando o programa SPAGeDi versão 1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002).

Resultados e Discussão

Diversidade genética nos adultos e subadultos

A população de *Theobroma speciosum* apresentou um alto nível de diversidade genética para os locos analisados, fator que pode estar relacionado à alta densidade da espécie na área amostral (31,25 ind.ha⁻¹), já que segundo Gusson et al. (2005), espécies que mantêm populações com alta densidade demográfica apresentam maiores níveis de diversidade genética do que as de baixa densidade, aumentando a probabilidade de ocorrerem mutações e a incorporação de novos alelos nas populações.

O número médio de alelos por loco variou de 07 (mTcCIR9) à 13 (mTcCIR3) nos adultos, enquanto que nos subadultos apresentou entre 07 (mTcCIR9) e 14 alelos (mTcCIR9) (Tabela 2). A média do número efetivo de alelos nos locos foi de 10,34 para os adultos e 10,57 para os subadultos, valores que corroboram com os encontrados por Nybom (2004), que revisou 106 estudos de diversidade genética intraespecífica em plantas silvestres com base em marcadores microssatélites e reportou uma média de 9,9 alelos por loco. Segundo Alves et al. (2007), a maioria das espécies arbóreas tropicais apresenta um grande número de alelos por loco e conseqüentemente uma alta heterozigosidade esperada.

Os adultos apresentaram um menor número total de alelos (52) do que o observado nos subadultos (53), sendo apenas um alelo exclusivo nos subadultos (Tabela 2). A presença de alelos exclusivos nos subadultos sugere fluxo gênico externo à área de estudo, ou seja, os parentais não se encontram na população amostrada.

O número efetivo de alelos por loco (A_e) foi menor do que o número médio de alelos por locos (k) em ambos adultos e subadultos (Tabela 2) exceto loco mTcCIR3 nos subadultos e mTcCIR9 nos adultos, indicando que muitos alelos são raros (frequência $\leq 0,05$), o que ressalta a importância da manutenção de unidades de conservação, como o Parque Nacional do Juruena, no sentido de manter a diversidade genética da espécie, uma vez que a perda de alelos raros pode ter um impacto a longo prazo na dinâmica genética da população, pois representam um potencial genético na adaptação de populações à seleção natural (BUCHERT et al., 1997; RAJORA et al., 2000).

A heterozigosidade média esperada (H_e) estimada para cada loco foi maior que a média da heterozigosidade observada (H_o) para todos os locos analisados. A heterozigosidade esperada (H_e) variou entre 0,735 (loco mTcCIR9 nos subadultos) e 0,915 (loco mTcCIR3 nos subadultos), enquanto que a heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,149 (loco mTcCIR10 nos subadultos) à 0,600 (loco mTcCIR3 nos subadultos) (Tabela 2).

Alves et al. (2007), em estudo com populações naturais e cultivadas de *T. grandiflorum*, utilizando 21 locos microssatélites obtiveram também valores superiores para H_e (0,419) em comparação com H_o (0,355), Motamayor et al. (2002) e Sereno et al. (2006) em pesquisas com *T. cacao*, obtiveram valores equivalentes, $H_e = 0,540$ e $0,566$; $H_o = 0,347$ e $0,413$, respectivamente.

Contudo, Lemes et al. (2007) em estudo com três espécies de *Theobroma* utilizando 13 locos microssatélites, obtiveram valores diversos para H_e e H_o , para uma população cultivada de *T. grandiflorum* reportaram valores maiores para H_e (0,78) do que para H_o (0,67), já para as populações nativas de *T. subincanum* e *T. sylvestris*, encontraram valores maiores para H_o (0,73 e 0,61) do que para H_e (0,68 e 0,43).

Muitas espécies arbóreas neotropicais ocorrem com uma densidade menor do que a observada em regiões temperadas, com aglomeração de indivíduos, o que tende a reduzir a diversidade genética intrapopulacional devido ao pequeno tamanho efetivo da população, enquanto favorece a diferenciação populacional (LEMES et al., 2003; NOVICK et al., 2003; DUTECH et al., 2004). Tal como observado neste estudo, muitas espécies arbóreas tropicais apresentam baixa heterozigosidade observada, podendo derivar de um sistema de cruzamento que favorece a endogamia biparental ou a autofecundação (COLLEVATTI et al., 2001; DUTECH, 2004).

Uma importante consequência da estrutura genética espacial detectada em várias espécies arbóreas tropicais estudadas anteriormente (DEGEN et al., 2004; HARDY et al., 2006) tem sido a comum observação de cruzamentos entre parentes, resultando em excesso de homozigotos comparado com o esperado nas proporções de Hardy-Weinberg.

A estimativa do número médio de alelos por locos (k), o número efetivo de alelos por loco (A_e), e a heterozigosidade observada (H_o) foram

maiores nos subadultos do que nos adultos, enquanto que a estimativa do índice de fixação (F) foi menor nos subadultos que nos adultos (Tabela 2). Isso demonstra que os subadultos têm maior diversidade genética e menor endogamia do que os adultos. Uma explicação para este resultado é de que os subadultos representam a recombinação entre muitos genótipos de uma população muito maior do que a constituída pelos adultos, ou seja, a área reprodutiva da população é maior que a área amostrada.

O índice de fixação foi positivo e significativamente diferente de zero para todos os locos analisados para ambos adultos e subadultos (Tabela 2), sugerindo desvios das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido ao excesso de homozigotos, provavelmente por endogamia. Segundo Kageyama et al. (2003b), o índice de fixação é um dos parâmetros mais importantes em genética de populações, por medir o balanço entre homozigotos e heterozigotos nas populações.

Theobroma speciosum é considerada uma espécie auto-incompatível (SOUZA & VENTURIERI, 1998). Segundo Silva & Martins (2004), possui síndrome floral adequada à polinização por dípteros saprófagos, sendo *Drosophila* sp. seu principal polinizador, assim, o índice de fixação apresentado pode ser justificado apenas por endogamia biparental.

Outra explicação para os altos níveis de endogamia observados em ambos adultos e subadultos pode ser a presença de alelos nulos (que falharam na amplificação por causa de mutações no flaqueamento nos sítios dos primers), dominância alélica ou uma transmissão de alelos tendenciosa (NYBOM, 2004).

TABELA 2. Diversidade genética e endogamia em locos microssatélites de árvores adultas e subadultas de *Theobroma speciosum*.

Loco	k	A_e	H_o	H_e	F
Adultos (N= 49)					

mTcCIR3	13	12,87	0,333	0,911	0,634*
mTcCIR9	07	7,00	0,184	0,791	0,767*
mTcCIR10	12	11,85	0,124	0,910	0,863*
mTcCIR17	10	9,97	0,372	0,899	0,586*
mTcCIR22	10	9,99	0,386	0,897	0,569*
Média	10,40 [£]	10,34	0,280	0,882	0,682*
EP _(95%)	± 2,06	± 2,00	± 0,106	± 0,046	± 0,113
Total	52	-	-	-	-
<hr/>					
Subadultos (N=51)					
mTcCIR3	14	14	0,600	0,915	0,344*
mTcCIR9	07	6,95	0,227	0,735	0,691*
mTcCIR10	12	11,97	0,149	0,914	0,836*
mTcCIR17	10	9,99	0,424	0,896	0,526*
mTcCIR22	10	9,96	0,465	0,878	0,470*
Média	10,60 [£]	10,57	0,373	0,868	0,569*
EP _(95%)	± 2,33	± 2,35	± 0,164	± 0,068	± 0,172
Total	53	-	-	-	-

k é o número total de alelos em cada loco e para todos os locos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; F é o índice de fixação. $EP_{(95\%)}$ = calculado por reamostragem jackknife entre locos * $P < 0,05$. $£$ = Número médio de alelos nos locos (A).

Alelos nulos aumentam o número de indivíduos supostamente homozigotos, visto que apenas um dos alelos amplifica em caso de plantas heterozigotas para o alelo nulo. Existem fortes indícios da segregação de alelos nulos nesses locos, pois vários indivíduos apresentaram ausência de

amplificação em alguns locos. No entanto, a presença de alelos nulos ou dominância alélica é difícil de ser demonstrada, requerendo experimentos específicos, como descrito por Morand et al. (2002).

Uma hipótese alternativa para estes altos níveis de endogamia é a presença do efeito Wahlund, segundo o qual o aumento da taxa de homozigose seria causado pela subdivisão da diversidade genética total da espécie em populações (KAGEYAMA, 2003b). Alves et al. (2007) relataram índice de fixação positivo para populações naturais de *T. grandiflorum* e também não descartaram a possibilidade do efeito Wahlund devido a possível existência de subunidades de reprodução temporais no interior das regiões da amostra.

Distribuição espacial dos genótipos

Ao analisar o distograma entre a distância genética de Gregorius (1978) e as classes de distância espacial (Figura 2), o padrão espacial é evidenciado pelos valores abaixo do valor de referência nas menores classes de distância e maior nas últimas classes de distância.

Nota-se que na população o valor da distância genética é menor e significativo a 95% de probabilidade até aproximadamente a metade da classe de distância quatro (raio de aproximadamente 70 m), e maior e significativo a partir do início da classe cinco (75 m). Isto sugere que árvores de *T. speciosum* localizadas até 70 m distantes entre si, apresentam algum grau de parentesco e a partir dessa distância as árvores passam a apresentar um padrão aleatório e divergente em termos de frequências alélicas.

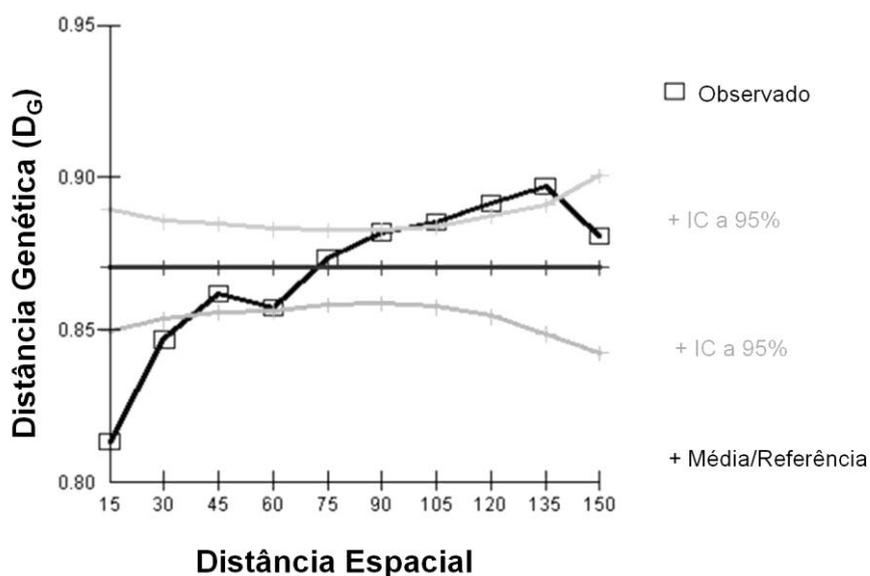


FIGURA 2. Distograma para a Distância Genética de Gregorius por classes de distância entre árvores em uma população de *Theobroma speciosum*.

A análise da distribuição espacial do genótipo de *T. speciosum* a partir da estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de árvores por classes de distância também detectou estrutura genética espacial até a distância de aproximadamente 70 m entre as árvores (Figura 3), com valores variando entre $\theta_{xy} = 0,0446$ e $\theta_{xy} = 0,009$.

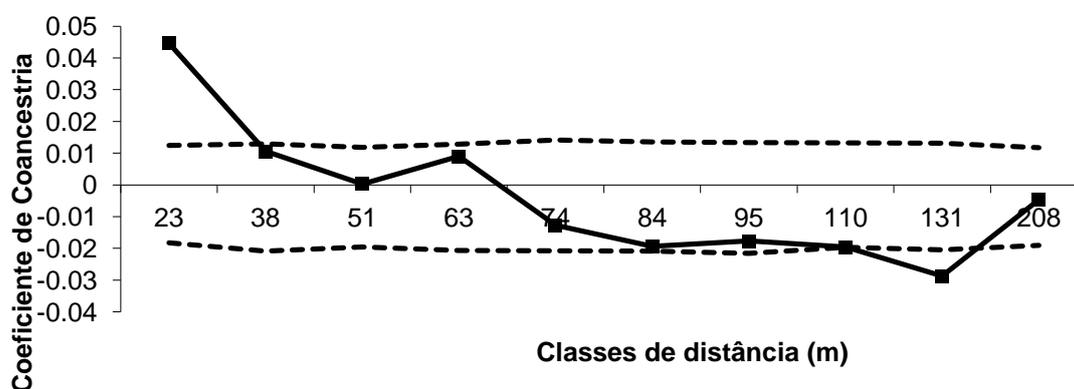


FIGURA 3. Correlograma plotando o coeficiente de coancestria em diferentes classes de distância entre árvores em uma população de *Theobroma speciosum*. Linha pontilhada: intervalo de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente médio de coancestria estimado. Linha contínua: variação da coancestria.

De acordo com o correlograma, as sementes de *T. speciosum* são dispersas até aproximadamente 70 m de distância da árvore matriz, a consequência da estrutura genética espacial é a possibilidade de ocorrerem cruzamentos entre indivíduos parentes, gerando endogamia biparental e consequentemente, depressão por endogamia biparental, pois a espécie apresenta mecanismos de auto-incompatibilidade.

A presença de cruzamentos entre indivíduos aparentados sugere a existência de estrutura de famílias dentro da população. Esta hipótese é aceitável, considerando a característica demográfica da espécie, pois o padrão espacial agregado mostrou-se estar associado à estrutura genética. Segundo Kageyama et al. (2003b), o agrupamento é formado pelas características de dispersão das espécies, em que grandes quantidades de sementes são depositadas nas vizinhanças das árvores matrizes, esta característica

dispersiva aumenta a probabilidade do estabelecimento de filhos próximos à árvore matriz e cruzamentos entre indivíduos aparentados, como os detectados neste estudo.

Cruzamentos entre indivíduos aparentados têm sido relatados em estudos do sistema de reprodução em populações naturais de diversas espécies arbóreas tropicais (O'MALLEY et al., 1987; MURAWSKI & HAMRICK, 1991; HALL et al., 1995; BOSHIER et al., 1995; LEE, 2000; SCHIMIDT- ADAM et al., 2000; SEBBENN et al., 2000; SEOANE et al., 2001; SOUZA et al., 2003), reforçando a hipótese de estrutura genética espacial e que parte do fluxo gênico é restrito às vizinhanças das árvores maternas.

Alves et al. (2003) também detectaram cruzamentos entre indivíduos aparentados em uma população natural de *T. grandiflorum*, pois 93% dos indivíduos de progênes de polinização aberta que analisaram em seu estudo apresentaram-se irmãos-completos ($\theta_{xy} = 0,25$).

Segundo Kageyama (2003a), a coancestria reduz o tamanho efetivo, aumenta a endogamia nas progênes, acima do esperado simplesmente pelo acaso (meios-irmãos). Assim, a alta coancestria na primeira classe de distância ($\theta_{xy} = 0,0446$) está diretamente relacionada ao excesso de homozigotos na população. Estas altas estimativas são comuns nas espécies com distribuição espacial agregada que dependem da ação de insetos polinizadores (KAGEYAMA, 2003b), como a espécie em estudo.

A combinação de grandes vizinhanças e comportamento dos polinizadores, visitando árvores próximas e de forma sistemática, poderia explicar as altas proporções de parentesco nas progênes desta espécie. No entanto, são necessários estudos complementares sobre a biologia reprodutiva das espécies e do comportamento dos polinizadores, a fim de se entender melhor a ocorrência dos cruzamentos biparentais.

Outro fator que pode explicar a alta coancestria observada neste estudo é o número de adultos e subadultos encontrado na população, que evidencia a expansão da população, pois apresentou mais indivíduos subadultos (DAP < 5 cm) do que indivíduos adultos (DAP > 5), os quais provavelmente são os pais dos jovens (KAGEYAMA, 2003a).

Segundo Kageyama et al. (2003b) a estrutura genética de espécies arbóreas tropicais está associada à padrões reprodutivos e demográficos dentro das populações, em que espécies que apresentam maiores taxas de cruzamento, distribuição agregada e alta densidade populacional apresentam menor divergência genética do que as espécies com maiores taxas de autofecundação e baixa densidade populacional.

Silva et al. (2011), em estudo com uma população natural de *T. cacao* no estado do Pará, amostraram 156 indivíduos em uma área de aproximadamente 0,56 ha (278,57 ind.ha⁻¹) e relataram uma estrutura espacial significativa até o raio de quinze metros, os autores justificaram essa alta correlação espacial pela presença de clones e também pelo padrão agregado dos indivíduos.

No presente estudo também foi observado um padrão agregado de indivíduos e a coancestria apontou a presença de clones na população, contudo, foi analisada uma área de 3.2 ha e amostrados 100 indivíduos, denotando uma densidade muito inferior à analisada por Silva et al. (2011) (31,25 ind.ha⁻¹), fato que pode justificar a diferença no limite de vizinhança genética nos dois trabalhos.

Vários estudos com espécies arbóreas nativas têm relatado a presença de estrutura genética espacial entre os indivíduos, contrastando com a teoria geral de que, em populações naturais, existe o predomínio de cruzamentos aleatórios (KAGEYAMA, 2003b).

Barreira et al. (2006) detectaram forte estrutura genética espacial em uma população natural de *Eremanthus erythropappus* (300 ind.ha⁻¹), com árvores próximas entre si em até 180 m, Bittencourt & Sebbenn (2007) relataram uma estrutura genética espacial significativa entre árvores adultas, subadultas e plântulas de *Araucaria angustifolia* (42 ind.ha⁻¹) até 50 m de distância, o que segundo os autores indica uma dispersão de sementes à curtas distâncias, Gusson et al. (2005) ao estudarem a diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata* amostraram mais de 20 indivíduos adultos por hectare e obtiveram padrão espacial nas classes iniciais até 65 m.

Implicações para conservação e coleta de sementes

Informações de ecologia e genética em populações naturais de espécies arbóreas tropicais são incipientes na literatura, em função da alta diversidade e complexidade de espécies, trazendo dificuldades na amostragem e nas metodologias apropriadas para seu estudo.

Esse conhecimento é essencial para o entendimento da estrutura genética das populações e, portanto, para o delineamento de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentado (definição de tamanho de reservas, manejo adequado das espécies, recuperação de áreas degradadas, coleta de sementes para plantios com espécies nativas) (KAGEYAMA et al. 2003b). Tais informações são importantes para adoção de estratégias para a conservação da Floresta Amazônica, gerando indicadores para estabelecimento e manejo de reservas genéticas *in situ*, assim como para a implantação de corredores de fluxo gênico entre pequenas reservas.

O reconhecimento da existência de estruturação genética espacial nas populações da espécie auxilia no estabelecimento de medidas de conservação genética, indicando formas de maximizar a diversidade genética na coleta de sementes para programas de conservação *ex situ*, melhoramento genético, recuperação de áreas degradadas, bem como inferir sobre tamanhos mínimos de área para a conservação *in situ*.

Por exemplo, com base nos presentes resultados, pode-se inferir que a coleta de sementes de *T. speciosum* não deve ser realizada em árvores localizadas dentro de distâncias inferiores a 70 m, a fim de evitar amostrar sementes de árvores parentes, o que reduziria o tamanho efetivo de variância (tamanho efetivo na população descendente). Contudo, é importante ter-se em mente que mesmo utilizando esta estratégia, as sementes coletadas podem reter algum grau de endogamia biparental, se os cruzamentos ocorrerem dentro das vizinhanças das árvores maternas, conforme observado por Gusson et al. (2005).

Considerando a alta densidade demográfica da espécie e o tamanho da área estudada, combinados com o alto número médio de alelos por locos e a presença de alelos raros, pode-se afirmar que a população estudada apresenta alto valor para a conservação genética *in situ* de *T. speciosum*, bem como para a coleta de germoplasma visando sua conservação *ex situ* e coleta

de sementes, seja para a formação de mudas destinadas à restauração de áreas degradadas bem como para o melhoramento florestal.

Conclusões

- A população estudada de *T. speciosum* apresenta níveis de diversidade genética representativos, logo o estabelecimento de unidades permanentes de conservação como o Parque Nacional do Juruena é uma ferramenta valiosa para preservar a diversidade genética entre os indivíduos de populações naturais;

- Os indivíduos subadultos apresentaram maior diversidade genética e menor endogamia do que os adultos;

- A coleta de sementes de *T. speciosum* não deve ser realizada em árvores localizadas dentro de distâncias inferiores a 70 m;

- A diversidade genética detectada na população de *T. speciosum* estudada, encontra-se espacialmente estruturada dentro da população, sendo que quanto mais próximas às árvores, maior é a probabilidade delas serem aparentadas.

Referências Bibliográficas

ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D. A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1474–1486, 1999.

ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) **Tree Genetics & Genomes**, v. 3, p. 289–298, 2007.

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

BALÉE, W. **Footprints of the Forest – Ka’apor ethnobotany – the historical ecology of Plant Utilization by an Amazonian people**. New York: Columbia University Press, 1994. 369p.

BARREIRA, S.; SEBBENN, A. M.; SCOLFORO, J. R. S.; KAGEYAMA, P. Y. Conseqüências da exploração florestal sobre a diversidade genética e o sistema de reprodução de uma espécie arbórea tropical de alta densidade populacional, *Eremantus erythropappus*. **Scientia Forestalis**, v. 71, p. 119-130, 2006.

BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil by paternity analysis. **Heredity** v. 99, p. 580-591, 2007.

BOSHIER, D.H.; CHASE, M.R.; BAWA, K.S. Population genetic of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree: 3- gene flow, neighborhood and population substructure. **American Journal of Botany**, v.82, n.4, p.484-490, 1995.

BUCHERT, G. P.; RAJORA, O. P.; HOOD, J.V. Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine in Ontario, Canada. **Conservation Biology**, v. 11, p. 747–758, 1997.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 51–57, 1996.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliensis*, and endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 86, p. 60–67, 2001.

DEGEN, B.; BANDO, E.; CARON, H. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. **Heredity**, v. 93, p. 585–591, 2004.

DEGEN, B. Spatial genetic software (SGS): version 1.0d. **Silvolab Guyane**. Cedex: INRA Station de Recherches Forestières, 2003. Disponível em: <<http://korov.cirad.fr/genetique>>. Acesso em; 28 dez. 2013.

DEWALT, S.J.; BOURDY, G.; MICHEL, L.R.C. de; QUENEVO, C. Ethnobotany of the Tacana: quantitative inventories of two permanent plots of northwestern Bolivia. **Economic Botany**, v.53, n.3, p.237-260, 1999

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p.11–15, 1987.

DUCKE, A. As espécies brasileiras de cacau (gênero *Theobroma* L.), na botânica sistemática e geográfica. **Rodriguésia**, v.4, n.13, p.265-276, 1940.

DUTECH C.; JOLY H. I.; JARNER P. Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guiana populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. **Heredity**, v. 92, p. 69–77, 2004.

ELLEGREN H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435–445, 2004.

GILBERT-ESCRIVÁ, M. V.; GONÇALVES, L. A. G.; SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behavior of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 82, p.1425- 1431, 2002.

GOUDET , J. Fstat. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. **Journal Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., MELO, I. S., VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Fundação MT, Rondonópolis/MT. p. 967-1010, 2001.

GREGORIUS H. R. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. **Mathematical Bioscience**, v. 41, p. 217-222, 1978.

GUSSON E.; SEBBENN A. M.; KAGEYAMA P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess) Miers. **Scientia Forestalis**, v. 66, p. 123-135, 2005.

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K.S. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, v.10, n.3, p. 57-768, 1995.

HARDY O. J.; MAGGIA L.; BANDOU E.; BREYNE P.; CARON H.; CHEVALLIER M. H.; DOLIGEZ A.; DUTECH C.; KREMER A.; LATOUCHE-HALLÉ C.; TROISPOUX V.; VERON V.; DEGEN B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 559-571, 2006.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 618-620, 2002.

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

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

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Florestalis**, v.64, p.93-107, 2003b.

KAGEYAMA, P.Y.; CUNHA, G.C.; BARRETO, K.D.; GANDARA, F.B.; CAMARGO, F.R.A.; SEBBENN, A.M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia florestalis**, v.64, p.108-119, 2003a.

LANAUD C.; RISTERUCCI A. M.; PIERETTI I.; FALQUE M.; BOUET A.; LAGODA P. J. L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 2141–2143, 1999.

LAURANCE, W. F.; VASCONCELOS, H. Consequências ecológicas da fragmentação florestal na Amazônia. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, p. 434-451, 2009.

LEE, S.L. Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. F. (Dipterocarpaceae) in three different forest types and a seed orchard. **Heredity**, v.85, p.338-345, 2000.

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

LEMES, M. R.; MARTINIANO, T. M.; REIS, V. M.; FARIA, C. P.; GRIBEL, R. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for three species of *Theobroma* (Sterculiaceae) from the Brazilian Amazon. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 1653-1657, 2007.

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

MANLY, B. F. J. 1991. **Randomization and Monte Carlo Methods in Biology**. Chapman & Hall, London. 240 p.

MORAND, M. E.; BRACHET, S.; ROSSIGNOL, P.; DUFOUR, J.; FRASCARIA-LACOSTE, N. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 377–385, 2002.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175–182, 1993.

MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M.; LOPEZ, P. A.; ORTIZ, C. F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, v. 89, p. 308–386, 2002.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v.67, p.167-174,1991.

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

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

O'MALLEY, D. M.; BAWA, K. S. Mating system of a tropical rain forest tree species. **American journal of botany**, v.74, n.8, p.1143-1149, 1987.

PNJU - PARQUE NACIONAL DO JURUENA. Disponível em: <<http://www.parquenacionaldojuruena.com.br>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

RAJORA, O. P.; RAHMAN, M. H.; BUCHERT, G. P.; DANKIK, B. P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobes*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 339–348, 2000.

RAPOSO, A. Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie. **Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)** – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.143 p.

SCHIMIDT-ADAMS, G.; YOUNG, A. G.; MURRAY, B. G. Low outcrossing rates and shift in pollinators in New Zealand Pohutukawa (*Matrosideros excelsa*; Myrtaceae). **American journal of botany**, v.87, n.9, p.1265-1267, 2000.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C.M. F.; ZANATTO, A. C. E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Florestalis**, v. 58, p. 25-40, 2000.

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

SEOANE, C.E.C; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, v.13, n.1, p.19-26, 2001.

SERENO M. L.; ALBUQUERQUE P. S. B.; VENCOSKY R.; FIGUEIRA A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, v. 6, p. 13–24, 2006.

SILVA, A. R.; MARTINS, M. B. A new anthophilic species of *Drosophila* Fallén belonging to the bromeliae group of species (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 435–437, 2004.

SILVA, B. M.; ROSSI, A A. B.; DARDENGO, J. F. E.; CARVALHO, M. L. S.; SILVA, C. J. Estrutura e padrões de distribuição espacial de duas espécies de *Theobroma* em um parque de preservação permanente no norte do estado de mato grosso. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17, p. 2789 – 2795, 2013.

SILVA, C. R. S.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; EVERDOSA, F. R.; MOTA, J. W.S.; FIGUEIRA A.; SEBBENN, A. M. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. **Heredity**, v. 106, p. 973–985, 2011.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em população de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil (Bombacaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.1, p.113-121, 2003.

SOUZA, M. S.; VENTURIERI, G. A. Floral phenology and breeding system of cacauehy (*Theobroma speciosum* Willdenow – Sterculiaceae). Projeto: Biologia aplicada a domesticação de fruteiras amazônicas do gênero *Theobroma*. In: **Primeiro relatório**, Belém, 105p, 1998.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends Ecology Evolution**, n. 15, p.199–203, 2000.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnology**, v. 23, p. 48–55, 2005.

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

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1–16, 2002.

3.2 ESTRUTURA ESPACIAL DE *Theobroma subincanum* Mart. E *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. NO PARQUE NACIONAL DO JURUENA, MATO GROSSO¹

¹ Artigo submetido no periódico "Revista Árvore".

Resumo – (Estrutura espacial de *Theobroma subincanum* Mart. e *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso). A análise dos padrões de distribuição espacial é uma ferramenta muito utilizada para entender o comportamento ecológico das espécies, pois embasa estratégias de manejo e influencia na estrutura populacional. Com o objetivo de estudar a estrutura horizontal das espécies *T. speciosum* (cacauí) e *T. subincanum* (cupuí), árvores silvestres com alto potencial alimentício, foi implementada uma grade de 200 x 160 m, dividida em 40 subparcelas de 20 x 40 m no Parque Nacional do Juruena – Mato Grosso. Nestas parcelas foram mensurados todos os indivíduos que apresentaram DAP > 1 cm. Os seguintes parâmetros foram analisados: número de indivíduos; densidade; altura total; área basal; distribuição diamétrica e distribuição espacial. A pesquisa amostrou 165 árvores de *T. speciosum* (51,56 ind.ha⁻¹) e 34 de *T. subincanum* (10,62 ind.ha⁻¹) com diâmetro médio de 6,72 e 12,44 cm respectivamente. Em relação à distribuição espacial, *T. speciosum* apresentou padrão de distribuição agregado, enquanto *T. subincanum* padrão aleatório. A distribuição diamétrica de *T. speciosum* seguiu uma distribuição em forma de “J” invertido, comportamento esperado para um ambiente florestal com pouca pressão antrópica. Já *T. subincanum* não seguiu o mesmo padrão. Entretanto as espécies demonstraram estar bem estabelecidas na área, com número de indivíduos significativo em todas as classes diamétricas. Assim, com base nos resultados apresentados é possível apontar a importância de áreas de conservação como forma de salvaguardar ambientes naturais das pressões exercidas por diferentes ações antrópicas e também a necessidade de estudos na região do bioma amazônico, para o estabelecimento do padrão de distribuição espacial de muitas outras espécies.

Palavras-chave: Cacauí; Cupuí; Amazônia.

Abstract - (Spatial structure of *Theobroma subincanum* Mart. and *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng in the Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso state, Brazil). Analysis of the spatial distribution is a very useful tool to understand the ecological behavior of the species because it provides information that underlie management strategies and influence the population structure. To study the horizontal structure of the species *T. speciosum* (cacauihy) and *T. subincanum* (cupui) in the Parque Nacional do Juruena - Mato Grosso, it was implemented one 200 x 160 m grid, divided in forty 20 x 40 m subplots. All individuals of the species under study that had DBH > 1 cm were measured. The following parameters: number of individuals, density, total height, basal area, diameter distribution and spatial distribution were analyzed. The research sampled 165 *T. speciosum* trees (51,56 ind.ha⁻¹) and 34 *T. subincanum* (10,62 ind.ha⁻¹) with a mean diameter of 6,72 and 12,44 cm respectively. In relation to spatial distribution, the *T. speciosum* individuals showed aggregated distribution pattern, while *T. subincanum* presented a random pattern. The diameter distribution of *T. speciosum* followed a distribution in the form of inverted "J", behavior expected for a forest environment with low anthropic pressure, as *T. subincanum* not followed the same pattern, however the species proved to be well established in the area, with a significant number of individuals in all diameter classes thus, the results

indicate the importance of conservation areas established in order to safeguard the natural environment from the pressures of different anthropic actions, and also the need for studies in the region of the Amazon biome, to establish the spatial distribution pattern of many other species.

Keywords: Cacauihy; Cupui; Amazonia.

Introdução

Nos dias atuais, uma das maiores ameaças para a conservação das florestas tropicais é a transformação e a exploração deste habitat. A expansão das fronteiras agropecuárias, principalmente para a implantação de pastagens, tem elevado a taxa de perda de florestas nativas (SCHWARTZ et al., 2007). Tal exploração modifica significativamente a estrutura da floresta, atuando diretamente no padrão de distribuição espacial e fenológico das espécies nativas (COSTA & MAGNUSSON, 2003).

O Parque Nacional do Juruena (PNJu) é uma Unidade de Conservação de Proteção Integral administrada pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio). Localiza-se no norte de Mato Grosso e Sudeste do Amazonas, entre os municípios de Apuí e Maués (AM) e Apiacás, Cotriguaçu e Nova Bandeirantes (MT). Sua criação em 2006 representou uma das maiores ações de ordenamento e preservação do meio ambiente no Brasil (PNJU, 2013).

A importância ecológica, sócio ambiental e política desta área legalmente protegida tem aumentado devido localizar-se na fronteira da biodiversidade entre os biomas Cerrado e Amazônico, onde nos últimos anos, a Floresta Amazônica vem sendo paulatinamente fragmentada em ilhas, levando o estado de Mato Grosso a apresentar os maiores índices de desmatamento e de queimadas na Amazônia legal. Em consequência desta paisagem convertida, a região mostra atualmente um traçado no uso da terra, denominado nas políticas públicas como “Arco do desmatamento” e de “queimadas” (LOUREIRO, 2009).

Entre as espécies silvestres encontradas nessa unidade de conservação, estão o cacauí e o cupuí, pertencentes à família Malvaceae, com alto potencial alimentício (LORENZI, 2000). Segundo Ferrão (2001), estas espécies são comumente encontradas em áreas de terra firme, onde vivem à sombra de outras árvores.

O cacauí e o cupuí apresentam árvores de porte mediano, entretanto, a copa do cacauí é estreita e rala e seu fruto apresenta casca levemente aveludada (LORENZI, 2000), enquanto o cupuí apresenta copa

multirramificada e fruto com pericarpo duro e resistente, recoberto por um indumento semelhante ao do cupuaçu verdadeiro (CAVALCANTE, 1991).

Espécies nativas do gênero *Theobroma* têm despertado grande interesse da comunidade científica internacional, e o conhecimento da sua estrutura e dispersão é de fundamental importância para a ciência, sendo o primeiro passo para os programas de melhoramento genético e domesticação, facilitando as programações de coleta e preservação (DUARTE et al., 2010).

A distribuição espacial é uma ferramenta que auxilia na compreensão dos seus aspectos ecológicos, possibilitando analisar resultados que podem ajudar na compreensão da dependência espacial das espécies e do seu padrão de distribuição, fornecendo subsídios importantes para técnicas de manejo sustentável da floresta, auxiliando ainda em processos de amostragem e monitoramento de plantas em unidades de conservação (PEREIRA et al., 2006). A distribuição espacial é resultante de vários fatores que interagem entre si, como o tipo de solo, altitude, intensidade luminosa, presença de dispersores e polinizadores (BUDKE et al., 2004).

A distribuição do número de indivíduos em classes de tamanho é outro fator que determina a estrutura populacional de uma espécie e, segundo Salomão (1995), a maioria das espécies tropicais apresenta uma distribuição balanceada, entretanto Oliveira & Amaral (2004) consideram a distribuição em “J” invertido como característica de florestas nativas com pouca ou nenhuma pressão antrópica.

Os indivíduos arbóreos de uma espécie vegetal podem estar distribuídos espacialmente na comunidade de modo agrupado, ao acaso (aleatório) ou uniformemente (BROWER & ZAR, 1984). Espera-se que o comportamento da estrutura diamétrica de *T. speciosum* e *T. subincanum* seja em forma de “J” invertido, típico de espécies de floresta nativa, e sua distribuição espacial agregada, de acordo com a maioria dos estudos realizados em espécies de florestas de terra firme (SOUZA et al., 2011).

Diante disto, o presente estudo objetivou responder as seguintes questões: Qual a estrutura horizontal das espécies *T. speciosum* e *T. subincanum* no Parque Nacional do Juruena– Mato Grosso? A estrutura diamétrica das espécies em estudo apresenta um padrão característico

encontrado para espécies de florestas tropicais? Qual o padrão de distribuição espacial de *T. speciosum* e *T. subincanum*?

Material e Métodos

A área estudada localiza-se no Parque Nacional do Juruena, com área de 195.752.671 ha, sendo que 60% da área total do parque localiza-se no estado de Mato Grosso, distribuído pelos municípios de Apiacás (971.935 ha ou 50% da área do parque), Cotriguaçu e Nova Bandeirantes. O restante da área (40%) está localizado no estado do Amazonas, distribuído pelos municípios de Apuí e Maués (PNJU, 2013).

O Programa nacional da diversidade biológica em avaliações e identificações de áreas prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade da Amazônia brasileira (BRASIL, 2002) estabeleceu 27 eco-regiões para a Amazônia Legal Brasileira, entre as quais está parte da Amazônia legal Mato-Grossense, onde localiza-se o Parque Nacional Juruena. Esta Unidade de conservação (UC) abrange ainda as cabeceiras e trechos de importantes rios amazônicos, como o Aripuanã, afluente do Madeira, rios Juruena e Teles Pires, afluentes do Tapajós, constituindo uma zona de grande interesse biogeográfico.

Conforme Souza (2004), é possível identificar nesta região, a ocorrência de quatro grandes conjuntos de fisionomias: sub-montana, inter-montana, de terras baixas e riparia. Segundo a classificação de Köppen, a região apresenta clima tipo Awi, sendo tropical chuvoso com temperaturas médias entre 24 e 26°C e amplitude térmica anual de até 3°C. As chuvas são abundantes (mais de 2.500 mm.ano⁻¹) e regulares. No inverno, a região pode receber frentes frias originárias da massa polar atlântica, que são responsáveis pelo fenômeno da friagem, sendo que a queda brusca na temperatura que pode atingir 10°C (PNJU, 2013).

Para o levantamento dos dados estruturais da população de cada espécie, foi implementada uma grade de 200 x 160m (3.2 ha.grade⁻¹) dentro dos módulos de pesquisa implantados pelo Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBbio). Na grade de estudo foram distribuídas sistematicamente 40 parcelas contíguas com dimensões de 20 x 40m (800 m²) (Figura 1).

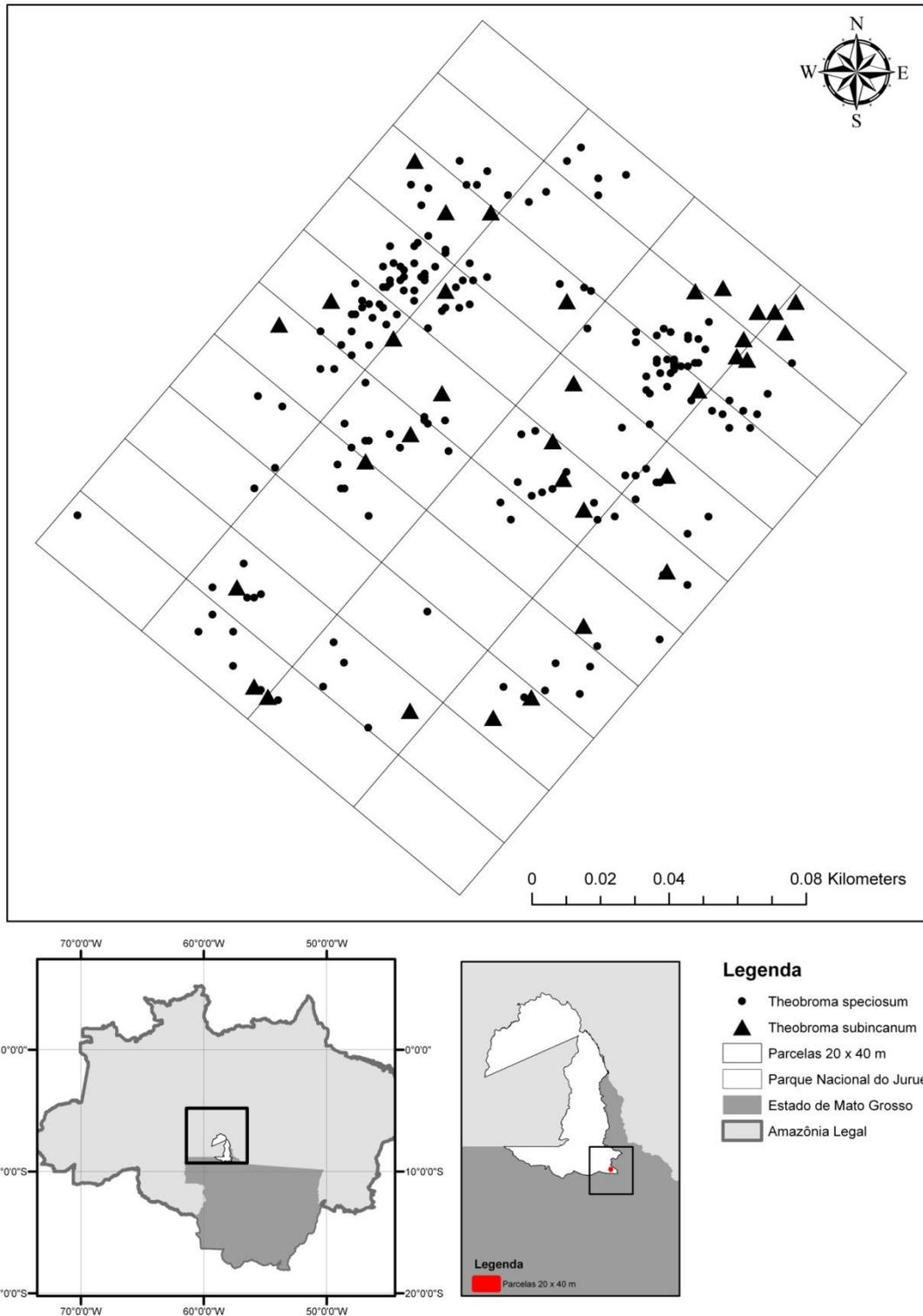


FIGURA 1. Localização geográfica das parcelas em estudo no Parque Nacional do Juruena.

Dentro das parcelas, foram mensurados altura e diâmetro de todos os indivíduos arbóreos vivos das espécies que apresentaram DAP (diâmetro a altura do peito medido a 1,30m do solo) > 1 cm, sendo todos georreferenciados.

A identificação taxonômica das espécies foi realizada com auxílio de parataxonomistas recrutados na região. Em seguida, todo material identificado foi descrito conforme o sistema de classificação Angiosperm Phylogeny Group versão II (SOUZA & LOREZI, 2005).

A estrutura horizontal das espécies foi caracterizada por meio das análises dos seguintes parâmetros: NI (Número de Indivíduos), D (Densidade); G (Área basal) (SOUZA et al., 2011), Distribuição Diamétrica e Distribuição espacial.

Para o estudo da distribuição diamétrica no ambiente, o número de classes a serem utilizadas foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Higuchi et al. (2008), que considera: $n \text{ classes} = 1 + 3,33 \log N$ (N = número de dados), sendo que o intervalo entre as classes foi ajustado segundo o número de classes. A análise da distribuição diamétrica foi elaborada por meio de histogramas (Figura 2), com número de indivíduos por centro de classes de diâmetro, iniciado pelo diâmetro mínimo de inclusão (1 cm), para a espécie *T. speciosum* utilizou-se 8 classes e para *T. subincanum* 6.

O padrão de distribuição espacial foi estimado através do índice de Morisita (I_d), conforme recomendações de Brower & Zar (1977):

$$I_d = \frac{n \cdot (\sum_{i=1}^s X^2 - N)}{N \cdot (N - 1)}$$

Em que, I_d : índice de Morisita; n : número total de parcelas amostradas; N : número total de indivíduos por espécies, contidos em n parcelas; X^2 : quadrado do número dos indivíduos por parcela; s : número de espécies amostradas.

A significância dos valores calculados para o índice de Morisita (I_d) foi obtida mediante o teste do qui-quadrado a um nível de significância de 0,05 de probabilidade de erro.

$$X^2 = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^s X^2}{N} - N$$

A interpretação do valor do qui-quadrado foi baseada nos seguintes parâmetros: se o valor calculado for menor que o valor tabelado, o I_d não difere significativamente de 1, e a espécie apresentará um padrão de distribuição aleatório. Porém, se o valor do qui-quadrado for maior que o valor tabelado, a espécie tenderá a um padrão de distribuição agregada, se ($I_d=1$), ou uniforme, ($I_d>1$) (BROWER & ZAR, 1977).

Resultados

Foram amostradas 165 árvores de *T. speciosum* e 34 de *T. subincanum*, sendo o diâmetro mínimo, médio e máximo encontrados respectivamente 1.11, 6.72 e 19.41 cm para *T. speciosum* e 1.59, 12.44 e 30.55 cm para *T. subincanum*. A densidade para *T. speciosum* foi de 51.56 (ind.ha⁻¹) e a área basal de 0.26 m².ha⁻¹. Já para *T. subincanum* a densidade encontrada foi de 10.62 (ind.ha⁻¹) e área basal de 0.17 m².ha⁻¹, para as 40 parcelas inventariadas (Tabela 1).

TABELA 1. Média e erro padrão da Densidade (ind.ha⁻¹), área basal (m².ha⁻¹), diâmetro (cm) e altura total (m) de *T. speciosum* e *T. subincanum* no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso.

Espécie	Densidade (ind.ha ⁻¹)	Área Basal (m ² .ha ⁻¹)	Diâmetro (cm)	Altura Total (m)
<i>T. speciosum</i>	51.56 ± 11.53	0.26 ± 0.005	6.72 ± 4.45	7.43 ± 4.45
<i>T. subincanum</i>	10.62 ± 1.15	0.17 ± 0.015	12.44 ± 6.84	12.43 ± 4.82

A maior parte dos indivíduos da espécie *T. speciosum* amostrados apresentou DAP nas classes entre 1-2,5 e 2,6-5,0 cm (74 indivíduos – 45%), (Figura 2A). Já para *T. subincanum*, apenas 5 (15%) indivíduos amostrados apresentaram essa mesma faixa de DAP (Figura 2B). Cerca de 71% dos indivíduos de *T. subincanum* foram alocados em três classes que compreendem juntas DAP de 5.1 a 20.0 cm (24 indivíduos), enquanto que *T. speciosum* apresentou apenas 19% (31 indivíduos) dos indivíduos com DAP acima de 10,1 cm. Além disso, observou-se que as espécies estudadas apresentaram indivíduos em todas as classes diamétricas.

A distribuição diamétrica dos indivíduos de *T. speciosum* (Figura 2A) seguiu o padrão característico das espécies de florestas nativas. Já a distribuição diamétrica dos indivíduos de *T. subincanum* (Figura 2B) não seguiu o padrão característico das espécies de florestas nativas, pois apresentou poucos indivíduos na faixa de DAP de 1,0 a 5,0 cm.

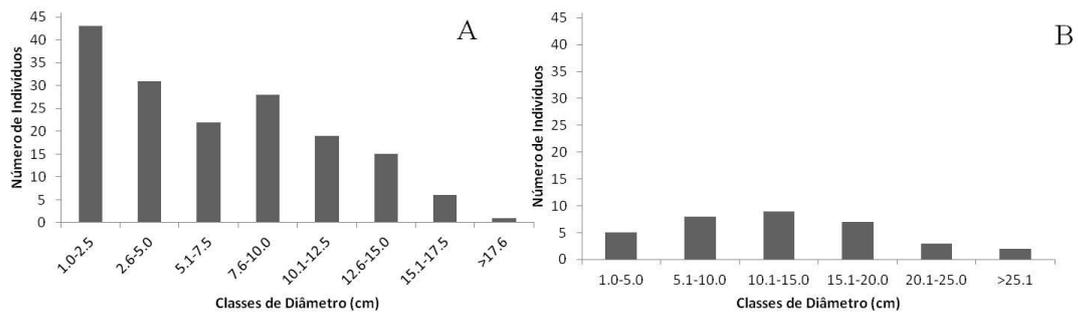


FIGURA 2. Distribuição diamétrica de *T. speciosum* e *T. subincanum* no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso. A - *T. speciosum*; B - *T. subincanum*.

Quanto à altura, os indivíduos de *T. speciosum* apresentaram média de 7,43 m e os de *T. subincanum* 12,43 m (Tabela 1). A maior parte dos indivíduos de *T. speciosum* apresentou altura entre 1,2 e 6,2 (48%) e os indivíduos de *T. subincanum* entre 6,3 e 11,2 (35%).

A relação de correspondência entre o diâmetro e a altura total apresentou tendência linear para ambas as espécies estudadas, contudo a espécie *T. speciosum* apresentou um valor de R maior (0,67) (Figura 3A) que *T. subincanum* (0,54) (Figura 3B).

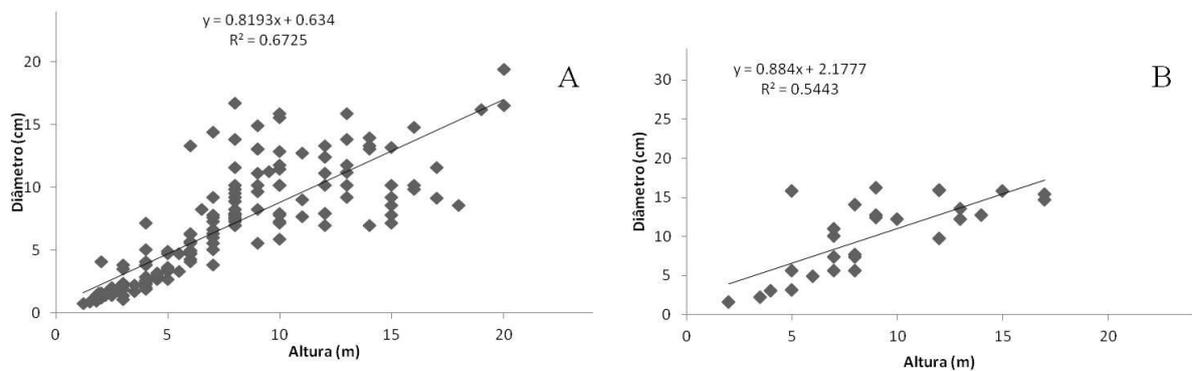


FIGURA 3. Relação hipsométrica de *T. speciosum* e *T. subincanum* no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso. A - *T. speciosum*; B - *T. subincanum*.

Em relação à distribuição espacial dos indivíduos, a espécie *T. speciosum* apresentou valor de qui-quadrado maior (153,78) que o tabelado (54,5) e *T. subincanum* valor menor (41,29), logo os indivíduos de *T. speciosum* possuem padrão de distribuição agregado, enquanto os indivíduos de *T. subincanum* apresentam padrão aleatório (Tabela 2).

TABELA 2. Demonstração dos valores encontrados no cálculo de distribuição espacial de *Theobroma speciosum* e *Theobroma subincanum* no Parque Nacional do Juruena, Mato Grosso.

Espécie	Índice de Morisita	X ² Cal	X ² Tab	Distribuição Espacial
<i>T. speciosum</i>	1.69	153.78	54.5	Agregado
<i>T. subincanum</i>	1.06	41.29	54.5	Aleatório

Discussão

Muitos estudos têm registrado a presença de *Theobroma speciosum* e *Theobroma subincanum* por todo bioma amazônico (HERAULT et al., 2010; AMARAL et al., 2011; TORRES, 1996; SANTOS et al., 2012; MARCHANT et al., 2002). Souza et al. (2011), ao estudarem *T. subincanum* no estado do Amapá, amostraram 37 árvores em uma área com aproximadamente 1,1 ha, com densidade de 33.63 ind.ha⁻¹ e área basal de 3.07 m².ha⁻¹, resultados superiores aos encontrados neste estudo para a espécie (10.62 ind.ha⁻¹ e 0.17 m².ha⁻¹). Para a espécie *T. speciosum*, em estudo realizado nas proximidades do Rio Xingú, no estado do Pará, Campbell et al. (1986) inventariaram 48 indivíduos em uma área de 4,5 ha, com densidade de 10,67 ind.ha⁻¹ e área basal média de 8.95 m².ha⁻¹, enquanto que no presente estudo, foram inventariados 165 indivíduos em uma área de 3,2 ha, revelando assim uma maior densidade (51.56 ind.ha⁻¹), porém uma menor área basal média (0.26 m².ha⁻¹) quando comparado aos resultados encontrados pelos autores anteriormente citados.

As espécies em estudo apresentaram média de diâmetro de 6.72 cm para *T. speciosum* e 12.44 cm para *T. subincanum*, valor semelhante ao verificado por Souza et al. (2011) que encontraram média de 11.63 cm em seu estudo com *T. subincanum*. Porém Guorlet-Fleury & Houllier (2000), numa floresta tropical de várzea na Guiana Francesa, utilizando como nível de inclusão DAP ≥10 cm, identificaram 57 indivíduos da mesma espécie com DAP médio de 17.38 cm, superior ao encontrado neste estudo.

Assim como no estudo de Souza et al. (2011), a distribuição diamétrica dos indivíduos de *T. subincanum* no presente trabalho, não seguiu o padrão característico de distribuição exponencial em forma de “J” invertido. Segundo os mesmos autores, esse comportamento pode ser explicado pelo fato da população em questão sofrer o efeito de fatores bióticos, abióticos ou até mesmo fatores intrínsecos à espécie dificultando sua regeneração, fazendo com que a taxa de mortalidade supere a taxa de crescimento.

Já a distribuição diamétrica dos indivíduos de *T. speciosum* aproximou-se do padrão característico de distribuição exponencial em forma de “J” invertido, o que, segundo Oliveira & Amaral (2004), demonstra ser o

comportamento para um ambiente florestal com pouca ou nenhuma pressão antrópica, padrão esperado para este estudo, já que a área amostral encontra-se em um parque de preservação permanente. Além disso, observou-se que ambas as espécies apresentaram-se distribuídas em todas as classes de diâmetro. Este tipo de comportamento, segundo Boufleuer (2004), é característico de espécies tolerantes à sombra, as quais mantêm uma taxa de estabelecimento de plântulas aproximadamente constante.

Quanto à altura, os indivíduos de *T. speciosum* apresentaram média de 7.43 m e os de *T. subincanum*, 12.43 m. Coelho et al. (2013), em estudo realizado no município de Itupiranga-PA, registraram a presença de *T. speciosum* em todos os estratos de altura analisados (estrato superior: indivíduos com DAP >10cm; estrato médio, com DAP <10 e altura ≥ 2.0 e estrato inferior com indivíduos apresentando altura < 2.0). Já *T. subincanum* foi encontrada apenas nos estratos superior e médio, confirmando a tendência de indivíduos de *T. subincanum* apresentarem maiores médias de altura que *T. speciosum*.

A relação de correspondência entre diâmetro e altura total foi linear para ambas as espécies estudadas. Paiva (2009), em estudo com castanheiras no estado do Amapá, obteve resultado similar.

Em relação à distribuição espacial, os indivíduos de *T. speciosum* apresentaram padrão de distribuição agregado, corroborando com os resultados de Santos et al. (2008) que também encontraram distribuição agregada para a mesma espécie em um fragmento rural no município de Alta Floresta, estado de Mato Grosso.

Os indivíduos de *T. subincanum* apresentaram padrão aleatório, diferentemente do encontrado por Souza et al. (2011) e Bentes-Gama et al. (2002), em cujos estudos a espécie denotou padrão agregado. Contudo, Queiroz et al. (2007) nas proximidades do rio Mutuacá, Amapá, encontraram distribuição uniforme para o mesmo gênero (*Theobroma* sp). Souza et al. (2011) afirmam que resultados sobre distribuição espacial têm sido controversos, o que poderia representar um comportamento distinto nas diferentes regiões na Amazônia, ou simplesmente refletir o emprego de diferentes metodologias de coleta de dados e análise da distribuição espacial.

O padrão de distribuição espacial de *T. speciosum* pode ser relacionado à elevada densidade de indivíduos encontrada ($51.56 \text{ ind. ha}^{-1}$), com participação de árvores de pequeno porte (DAP médio de 6.72 cm), tendendo a formar pequenas e densas manchas na vegetação, como observado em campo neste trabalho.

Espécies vegetais frequentemente apresentam distribuição espacial agrupada, isto é, formam grupos de indivíduos em decorrência das formas de reprodução, presença de distúrbios ou fatores ambientais que limitam sua distribuição, e até mesmo, pelas complexas interações entre membros da comunidade (PERRY & DIXON, 2002).

O tipo de reprodução e dispersão dos frutos pode explicar a distribuição agregada do cacauí. Segundo Lorenzi (2000), cada planta produz uma grande quantidade de frutos muito apreciados por mamíferos de médio porte, tais como macacos, e que associado à eficiência digestiva desses animais, contribui para a ocorrência de sombras de sementes agregadas nas imediações das plantas maternas. Este efeito pode, a longo prazo, contribuir para a ocorrência de padrões altamente agregados de parentesco genético, como observado no presente estudo (JORDANO et al., 2006).

Os vários padrões de distribuição espacial das árvores, da composição de espécies, da densidade, distribuição diamétrica e estrutura da floresta criam condições favoráveis para o desenvolvimento de processos naturais como mortalidade, regeneração, formação de clareiras, dentre outras responsáveis pela manutenção da biodiversidade e dos estágios de sucessão na floresta (MALTAMO et al., 2000). Logo, é interessante que as espécies vegetais apresentem diferentes padrões de distribuição, como os relatados neste estudo.

Assim, estudos como o presente trabalho são importantes, pois fornecem informações sobre a ecologia, subsidiam a definição de estratégias de manejo ou conservação, auxiliam em processos de amostragem ou simplesmente esclarecem a estrutura espacial de uma espécie (ANJOS et al., 1998).

Os resultados obtidos apontam para a importância de áreas de conservação como forma instituída para salvaguardar ambientes naturais das pressões exercidas por diferentes ações antrópicas e também a necessidade

de se ampliar as áreas de estudo na região de ocorrência do bioma amazônico, para possibilitar o estabelecimento do padrão de distribuição espacial não só das espécies do gênero *Theobroma*, como também de muitas outras, pois segundo Anjos et al. (2004), estas informações ainda são escassas para a maioria das espécies das florestas brasileiras.

Conclusões

- As espécies demonstraram estar bem estabelecidas na área, distribuídas com número de indivíduos significativo em todas as classes diamétricas;
- A distribuição diamétrica dos indivíduos de *Theobroma speciosum* seguiu o padrão característico encontrado para espécies de florestas tropicais, contudo, *Theobroma subincanum* não seguiu o padrão característico das espécies de florestas nativas;
- Os indivíduos de *T. speciosum* apresentaram padrão de distribuição agregado, enquanto os indivíduos de *T. subincanum* apresentaram padrão aleatório;
- Os resultados permitem inferir que o estado de conservação das espécies é satisfatório e também reafirmar a importância da manutenção de UC's como o Parque Nacional do Juruena.

Referências Bibliográficas

AMARAL, D. D.; MANTELLI, L. R.; DILCE, F. R. Palaeoenvironmental control on modern forest composition of southwestern Marajó Island, Eastern Amazonia. **Water and Environment Journal**, v. 26, p. 70-84, 2012.

ANJOS, A. et al. Análise de distribuição espacial de araucária (*Araucaria augustifolia*) em algumas áreas do Estado do Pará, utilizando a função K de Ripley. **Scientia Florestalis**, v. 66, p. 38-45, 2004.

ANJOS, A. et al. Análise do efeito de um manejo em regime de rendimento sustentável sobre o padrão de distribuição espacial do palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius), utilizando a Função K de Ripley. **Revista Árvore**, v. 22, n.2, p. 215- 225, 1998.

BENTES-GAMA, M. M. et al. Estrutura e Valoração de uma Floresta de Várzea Alta na Amazônia. **Cerne**, v.8, p. 88-102, 2002.

BOUFLEUER, N. T. **Aspectos ecológicos da andiroba (*Carapa guianensis* Aublet. Meliaceae) subsídios para o manejo**. 2004. 90 f. Dissertação (Ecologia e Manejo de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2004.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: MMA/SBF, 2002. 404 p.

BROWER, J. E.; ZAR, J. H. **Field and laboratory methods for general Ecology**. 2. ed. Dubique: Win. C. Brown Publishers, 1977. 226 p.

BUDKE, J. C. et al. Distribuição espacial de *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay (Orchidaceae) em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 31-35, 2004.

CAMPBELL, D. G. et al. Quantitative ecological inventory of terra firme and várzea tropical forest on the Rio Xingu, Brazilian Amazon. **Brittonia**, v. 38, p. 369-393, 1986.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5.ed. Belém: CEJUP/CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. 279p.

COELHO, R. F. R.; MIRANDA, I. S.; MITJA, D. Conservação das florestas do projeto de assentamento Benfica, sudeste da Amazônia. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 1, p. 1-17, 2013.

COSTA, F. R. C.; MAGNUSSON, W. E. Effects of selective logging on the diversity and abundance of flowering and fruiting understory plants on a Central Amazonian Forest. **Biotropica**, v. 35, p. 103- 114, 2003.

DUARTE, O. R. et al. Distribuição geográfica de Cupuí em Roraima. In: REUNIÃO REGIONAL DA SBPC EM BOA VISTA, 2010, Roraima. **Anais...** Roraima: SBPC, 2010. 1 CD-ROM.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. 652 p.

GOURLET-FLEURY S.; HOULLIER F. Modelling diameter increment in a lowland evergreen rain forest in French Guiana. **Forest Ecology and Management**, v. 131, p. 269-289, 2000.

HERAULT, B. et al. Growth responses of neotropical trees to logging gaps. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, p. 821-831, 2010.

HIGUCHI C. T. et al. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. **Química Nova**, v. 31, p. 1719-1721, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 269 p.

LOUREIRO, V.R. **A Amazônia no século XXI novas formas de desenvolvimento**. São Paulo: Ed. Empório do livro, 2009. 188 p.

JORDANO, P. et al. Ligando frugivoria e dispersão de sementes à biologia da conservação. In: ROCHA, C. F. D. et al. **Biologia da Conservação – Essências**. São Paulo: Rima, 2006. p. 1-26.

MALTAMO, M. et al. Comparison of percentile based prediction methods and the diameter distribution of heterogeneous Scots pine stands. **Forest Ecology and Management**, v.133, p. 263-274, 2000.

MARCHANT, R. et al. Distribution and ecology of parent taxa of pollen lodged within the Latin American Pollen Database. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 121, p. 1-75, 2002.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 21-34, 2004.

PAIVA, P. M. V. **A coleta intensiva e a agricultura itinerante são ameaças para os castanhais da reserva extrativista do rio Cajari?** 2009. 106 f. Dissertação (Biodiversidade Tropical). Universidade Federal do Amapá, Macapá, AM, 2009.

- PNJU - PARQUE NACIONAL DO JURUENA. Disponível em: <<http://www.parquenacionaldojuruena.com.br>>. Acesso em: 20 ago. 2013.
- PEREIRA, A. A. et al. Análise da distribuição espacial de Jequitibá Rosa em uma Floresta Estacional Submontana. **Revista Acadêmica**, v.4, n.2, p.21-34. 2006.
- PERRY J.N.; DIXON, P.M. A new method to measure spatial association for ecological count data. **Ecoscience**, v. 9, p. 133-141. 2002.
- QUEIROZ, J. A. L. et al. Estrutura e Dinâmica de Floresta de Várzea no Estuário Amazônico no Estado do Amapá. **Floresta**, v.37, p. 100-112, 2007.
- SALOMÃO R. P. et al. Estrutura populacional e breve caracterização ecológica – econômica de 108 espécies arbóreas da floresta amazônica brasileira – I. **Interciência**, v. 20, p 20 – 29, 1995.
- SANTOS, M. G. et al. Estrutura populacional de *Theobroma speciosum* Willd ex Spreng – Sterculiaceae. In: ENCONTRO PPBIO AMAZÔNIA ORIENTAL, 2008, Manaus. **Anais...** Manaus: PPBIO, 2008. 1 CD-ROM.
- SANTOS, R. C.; PIRES, J. L.; CORREA, R. X. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 59, p. 327–345, 2012.
- SCHWARTZ, G. Manejo sustentável de florestas secundárias: espécies potenciais no Nordeste do Pará, Brasil. **Amazônia: Ciências & Desenvolvimento**, v.3, p. 125-147, 2007.
- SOUSA, C. S. C. et al. Caracterização estrutural da espécie *Theobroma subincanum* Mart (Cupuí) na reserva extrativista do rio Cajari, Amapá- Brasil. In: 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 2011, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2011. 1 CD-ROM.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 463 p.
- TORRES, C. M. Archaeological evidence for the antiquity of psychoactive plant use in the Central Andes. **Museu Civico Rovereto**, v.1, p. 291-326, 1996.

**3.3 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA LUMINOSA NOS ASPECTOS ANATÔMICOS
DE FOLHAS DE *Theobroma speciosum* Willd ex Spreng. (MALVACEAE)
VISANDO DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO**

Resumo – (Análise da influência luminosa nos aspectos anatômicos de folhas de *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. (Malvaceae) visando diferentes estratégias de conservação). O conhecimento anatômico de *Theobroma* é importante para o estabelecimento e manutenção de coleções de germoplasma, tendo em vista estudos agronômicos, fitopatológicos e programas de melhoramento genético. Este estudo objetivou caracterizar a anatomia das folhas de *T. speciosum*, registrando as diferenças estruturais observadas entre folhas de sol e folhas de sombra. Folhas de indivíduos de *T. speciosum* foram coletadas no Parque Nacional do Juruena e em pastagens na zona rural do município de Alta Floresta - MT. Foram analisados a espessura do mesofilo foliar, dos parênquimas paliçádico e lacunoso, da nervura mediana e do feixe vascular. A análise de agrupamento foi realizada mediante a utilização do método Hierárquico UPGMA, com base na Distância Euclidiana média padronizada. Foram observados tricomas glandulares do tipo claviforme e tricomas estrelados sésseis. A epiderme é unisseriada, o mesofilo é dorsiventral, entretanto os parênquimas são pouco distintos. Feixes vasculares colaterais estão dispersos no mesofilo, formando bainhas que se estendem até as epidermes. A nervura central, em secção transversal, possui formato biconvexo, com sistema vascular fechado e envolto por bainha esclerenquimática. A constituição do mesofilo das folhas variou com o ambiente. Plantas expostas a pleno sol apresentam células mais alongadas no parênquima paliçádico (392,22 µm), parênquima lacunoso com mais camadas e maior quantidade de tricomas, enquanto que as folhas de sombra apresentaram células com muitos espaços intercelulares no mesofilo. O dendrograma indica a formação de dois grupos distintos: o grupo I composto pelas plantas do Parque e o grupo II composto pelas plantas das pastagens. Tal agrupamento demonstrou alterações anatômicas significativas ocasionadas pelas variações da intensidade luminosa sobre as folhas, o que evidenciou grande capacidade adaptativa de *T. speciosum*.

Palavras-chave: Cacauí; Amazônia; Mesofilo.

Abstract - (Analysis of the luminosity on the anatomical aspects of *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. (Malvaceae) leaves targeting different conservation strategies). The anatomical knowledge of *Theobroma* is important for the establishment and maintenance of germplasm collections, considering agronomic studies, phytopathological and breeding programs. This study aimed to characterize the anatomy of leaves of *T. speciosum*, recording the structural differences observed between sun leaves and shade leaves. *T. speciosum* leaves were collected at Juruena National Park and pastures in the rural municipality of Alta Floresta - MT. We analyzed the thickness of the leaf mesophyll, palisade and spongy parenchyma, and midvein vascular bundle. Cluster analysis was performed using the Hierarchical UPGMA method, based on the standardized mean Euclidean distance. Were observed glandular trichomes, type claviforme and sessile stellate trichomes, the epidermis is uniseriate in cross section, the species has a dorsiventral mesophyll and the parenchymas are little different. Collateral vascular bundles are dispersed in the

mesophyll, forming sheaths that extend up to the epidermis. The midvein, in cross section, has a biconvex shape, the vascular system presents closed and surrounded by sclerenchymatic sheath. The constitution of the leaves mesophyll varied with the environment, plants exposed to full sunlight showed longer cells in the palisade parenchyma, spongy parenchyma also showed many layers of overlapping cells, whereas shade leaves showed cells with many intercellular spaces, was noted presence in higher quantities of trichomes on sun leaves. The dendrogram indicated the formation of two distinct groups, group I comprises the plants of the park and pasture plants were allocated in group II, this clustering showed significant anatomical changes caused by variations of light intensity on the leaves, which revealed a large adaptive capacity of *T. speciosum*.

Key-words: Cacauihy; Amazonia; Mesophyll.

Introdução

As causas do desmatamento acelerado na Amazônia são várias e incluem a expansão da atividade pecuária, da agricultura de corte e queima, da extração madeireira e da agricultura comercial (FEARNSIDE, 2001). Segundo Laurance & Vasconcelos (2009), uma consequência direta e inevitável do desmatamento é a fragmentação florestal, que ocorre à medida que uma grande extensão de floresta é subdividida e diminui de tamanho.

Os estudos disponíveis indicam que a fragmentação florestal causa uma diversidade de efeitos, alterando o tamanho e a dinâmica das populações, a composição e a dinâmica das comunidades, as interações tróficas e os processos ecossistêmicos (LAURANCE & VASCONCELOS, 2009).

Diante disto, várias espécies típicas de sub-bosque estão ocorrendo em locais com alta incidência luminosa, em pastagens, como é o caso da espécie *Theobroma speciosum*. Quando se trata de intensidade luminosa, é importante levar em consideração as variações na estrutura foliar, pois, este é o órgão da planta que mais responde anatomicamente às variações luminosas de um determinado habitat (DICKISON, 2000).

As condições de solo, água, luz e temperatura influenciam no desenvolvimento e produtividade das plantas, muitas expostas à alta intensidade luminosa e, por mutações, adquirem mecanismos morfológicos e fisiológicos que possibilitam sua sobrevivência (SILVA et al., 2005). Esses mecanismos compreendem, na folha, principalmente, a redução do tamanho, capacidade de enrolamento, alta densidade de tricomas, estômatos profundos, acúmulo de mucilagem e outros metabólitos secundários e aumento da compactação do mesofilo (BOSABALIDIS & KOFIDIS, 2002). Assim, a intensidade de luz promove alterações na estrutura das folhas, resultando em folhas denominadas folhas de sol e folhas de sombra (CUTTER, 1978).

De acordo com Boeger & Wisniewski (2003), as folhas de sol apresentam características xeromórficas, oriundas de uma maior intensidade luminosa, menor disponibilidade de água no solo, deficiência de nutrientes no solo ou mesmo pela baixa temperatura. As características observadas nessas folhas são a presença de abundante cutícula, paredes celulares mais espessas, endoderme mais espessa, além de se verificar folhas pequenas e

compactas, parênquima paliçádico mais desenvolvido que o parênquima lacunoso, grande frequência de estômatos, e algumas vezes, células menores e abundante esclerênquima, ao contrário do que se observa, geralmente, em folhas de sombra, que por receberem uma menor intensidade luminosa não apresentam estas características (CUTTER, 1978).

Theobroma speciosum Willd. ex Spreng. (cacauí) está entre as espécies silvestres do gênero *Theobroma* L. e ocorre em toda a Amazônia brasileira. A espécie é importante por representar uma possível fonte de genes de resistência para outras mais importantes economicamente. Dentro do gênero, é a que apresenta teor de gordura mais parecido com o do cacau, sendo um sucedâneo potencial (SANTOS, 2003).

O cacauí é uma árvore de 8 à 14 metros, dotadas de copa estreita e rala, sendo suas folhas simples, alternas, dísticas, pecioladas e inteiras. O fruto apresenta casca levemente aveludada, de cor amarela quando maduro, possuindo cerca de 20 sementes imersas numa polpa suculenta, muito consumida por mamíferos de médio porte, tais como macacos (LORENZI, 2000).

O conhecimento anatômico de *Theobroma* torna-se útil para o estabelecimento e manutenção de coleções de germoplasma, tendo em vista que tais informações fornecem subsídios aos estudos agronômicos, fitopatológicos e programas de melhoramento genético (GARCIA, 2012). Entretanto, estudos anatômicos referentes às espécies pouco exploradas economicamente, como o cacauí são escassos, constando na literatura apenas trabalhos referentes às sementes (SANTOS, 2003; MARTINI et al., 2008).

O entendimento das relações anátomo-ecológicas ocorrentes nos vegetais, é uma das principais abordagens para o conhecimento do grau de adaptação das espécies aos nichos ecológicos ou de seus comportamentos sob condições ambientais extremas (LUTTGE, 1997). Para entender as estratégias adaptativas das plantas nos seus distintos estádios na dinâmica da floresta tropical e considerando também à contínua devastação, são necessárias a elaboração e execução de projetos de recuperação.

Os projetos devem estar embasados em informações obtidas a partir de estudos sistematizados das características do ambiente e das espécies vegetais que poderão colonizar áreas a serem recuperadas. A ausência de

estudos envolvendo espécies vegetais tropicais, especialmente arbóreas, com respeito às variações morfoanatômicas e fisiológicas de folhas provocadas pelas condições distintas de luminosidade, evidencia a necessidade de um quadro de informações científicas, que poderá subsidiar os projetos de reflorestamento (SILVA et al., 2005).

Assim, este trabalho teve por objetivo caracterizar a anatomia das folhas de *T. speciosum*, registrando-se também, as diferenças estruturais observadas entre folhas de sol (pastagem) e folhas de sombra (floresta ombrófila densa), visando avaliar sua capacidade adaptativa para a implantação de estratégias de conservação in situ e ex situ.

Material e Métodos

Folhas de indivíduos de *Theobroma speciosum* foram coletadas no Parque Nacional do Juruena e em pastagens na zona rural do município de Alta Floresta - MT. O parque apresenta uma área de 195.752.671 ha, com 60% no estado de Mato Grosso e 40% no Amazonas (PNJU, 2013). É possível identificar na região a ocorrência de quatro grandes conjuntos de fisionomias: sub-montana, inter-montana, de terras baixas e riparia. Segundo a classificação de Köppen, a região apresenta clima tipo Awi, sendo tropical chuvoso com temperaturas médias entre 24 e 26°C e amplitude térmica anual de até 3°C. As chuvas são abundantes (mais de 2.500 mm.ano⁻¹) e regulares (PNJU, 2013). O município de Alta Floresta, segundo a classificação de Köppen, apresenta clima tipo Awi, sendo tropical chuvoso com estação seca nítida de dois meses. A temperatura média anual varia entre 20 e 38°C, tendo média de 26°C. A precipitação pluviométrica é elevada (entre 2.500 a 2.750 mm), com intensidade máxima entre janeiro e março (FERREIRA, 2001).

As folhas do parque foram coletadas no mês de julho de 2012 e as folhas da pastagem em março de 2013, as mesmas foram fixadas em FAA, com graduação alcoólica de 50° GL, por 48 h, sendo estocadas posteriormente em etanol 70° GL (70% v/v) (JOHANSEN, 1940). Para a análise anatômica, foi escolhida a região mediana de folhas completamente desenvolvidas, ao nível do 5° nó visível de cinco indivíduos diferentes na área de pastagem e cinco na área de floresta. Secções transversais foram obtidas à mão livre, com o auxílio de lâmina de barbear, coradas com azul de astra e fucsina básica e montadas em lâminas histológicas (KAISER, 1880).

As ilustrações foram obtidas por meio do capturador de imagens, acoplado ao fotomicroscópio Leica DMLB, com o auxílio do programa Leica IM50.

Em seguida foi feita a caracterização anatômica das folhas e um estudo anatômico comparativo entre cinco folhas de árvores situadas na pastagem, expostas a uma maior intensidade luminosa, as quais foram chamadas “folhas de sol”, e cinco folhas de árvores localizadas no Parque, as quais foram denominadas “folhas de sombra”, registrando-se as diferenças encontradas.

Foram analisados a espessura do mesofilo foliar, dos parênquimas paliçádico e lacunoso, da nervura mediana e do feixe vascular com o auxílio do programa Anati Quant 2® UFV (AGUIAR et al., 2007). Cada tratamento (folhas de sol e sombra) consistiu em 10 repetições, sendo cinco indivíduos e duas lâminas de cada. As médias da espessura de cada tecido foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR 4.6 (FERREIRA, 2011).

A estimação da divergência entre os 10 indivíduos de cacauí por meio de características anatômicas quantitativas foi realizada mediante o emprego de análise multivariada. Na predição da divergência, utilizou-se a Distância Euclidiana média padronizada como medida de dissimilaridade (CRUZ & REGAZZI, 2001):

$$D_{ii'} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (X_{ij} - X_{i'j})^2}$$

em que $d_{ii'}$: distância entre os genótipos i e i' ; X_{ij} : observação no i -ésimo genitor em referência a j -ésima característica; n : número de características em estudo. A análise de agrupamento foi realizada mediante a utilização do método Hierárquico UPGMA, com base na Distância Euclidiana média padronizada (CRUZ & REGAZZI, 2001), utilizando os recursos computacionais do Programa Genes (CRUZ, 2006).

Resultados e Discussão

Foram observados tricomas glandulares no limbo do tipo claviforme, com pedúnculo bicelular e cabeça com 4-6 células (Fig. 1A) e tricomas estrelados sésseis no limbo com elevação no centro do tricoma, na região basal (Fig. 1B), cuja presença foi considerada por Cuatrecasas (1964) como um caráter diagnóstico em *Theobroma*. Santos (2003) descreveu tricomas glandulares claviformes na epiderme cotiledonar de espécies de *Theobroma*, incluindo *T. speciosum*, e Nakayama et al. (1996) nas folhas de *T. cacao*.

A epiderme é unisseriada em secção transversal, com células mais altas de paredes periclinais externas geralmente planas na face adaxial, e células menores de paredes periclinais externas convexas na face abaxial (Fig. 1C).

O mesofilo da espécie é dorsiventral (Fig. 1C), característica comumente encontrada em Malvaceae (KUBITZKI & BAYER, 2003). O parênquima paliçádico consiste em um a dois estratos e o parênquima lacunoso, é constituído por três estratos de células alongadas (Fig. 1C), de modo que os parênquimas são pouco distintos.

Os feixes vasculares colaterais estão dispersos no mesofilo, envoltos por células esclerenquimáticas e parenquimáticas, com conteúdo fenólico, formando bainhas que se estendem até as epidermes (Fig. 1C). Tal característica também é verificada em *T. cacao* (NAKAYAMA et al., 1996).

Extensões da bainha do feixe são consideradas como vias de transporte de substâncias, principalmente água, entre as nervuras e as células epidérmicas (BECK, 2010).

Os ductos encontram-se associados aos feixes vasculares (Fig. 1C). Idioblastos, contendo cristais prismáticos ou comumente drusas de oxalato de cálcio, ocorrem geralmente entre as células do parênquima paliçádico (Fig. 1D). Segundo Franceschi & Nakata (2005), os cristais de oxalato de cálcio têm várias funções nos vegetais, como o armazenamento de cálcio, proteção contra herbivoria e regulação da luz durante a fotossíntese em plantas de ambiente de sombra.

A nervura central, em secção transversal, possui formato biconvexo (Fig. 1E). Logo abaixo da epiderme abaxial ocorrem cerca de duas a três

camadas de colênquima angular-lacunar (Fig. 1B). Os resultados de Garcia (2012) corroboram com os encontrados em *T. speciosum* aqui estudada, em estudo anatômico com 3 espécies nativas de *Theobroma*, a autora constatou que a morfologia da nervura central, em secção transversal, mostrou similaridade entre *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, nas quais é côncava-convexa e variou em *T. speciosum*, destacando-se como biconvexa. O sistema vascular apresenta-se fechado e envolto por bainha esclerenquimática. Os feixes vasculares são colaterais, geralmente organizados em forma de anel, com um ou mais feixes acessórios externos ou encerrados na medula (Fig. 1F). Na porção central da nervura observa-se um ducto secretor de mucilagem (Fig. 1E, 1F).

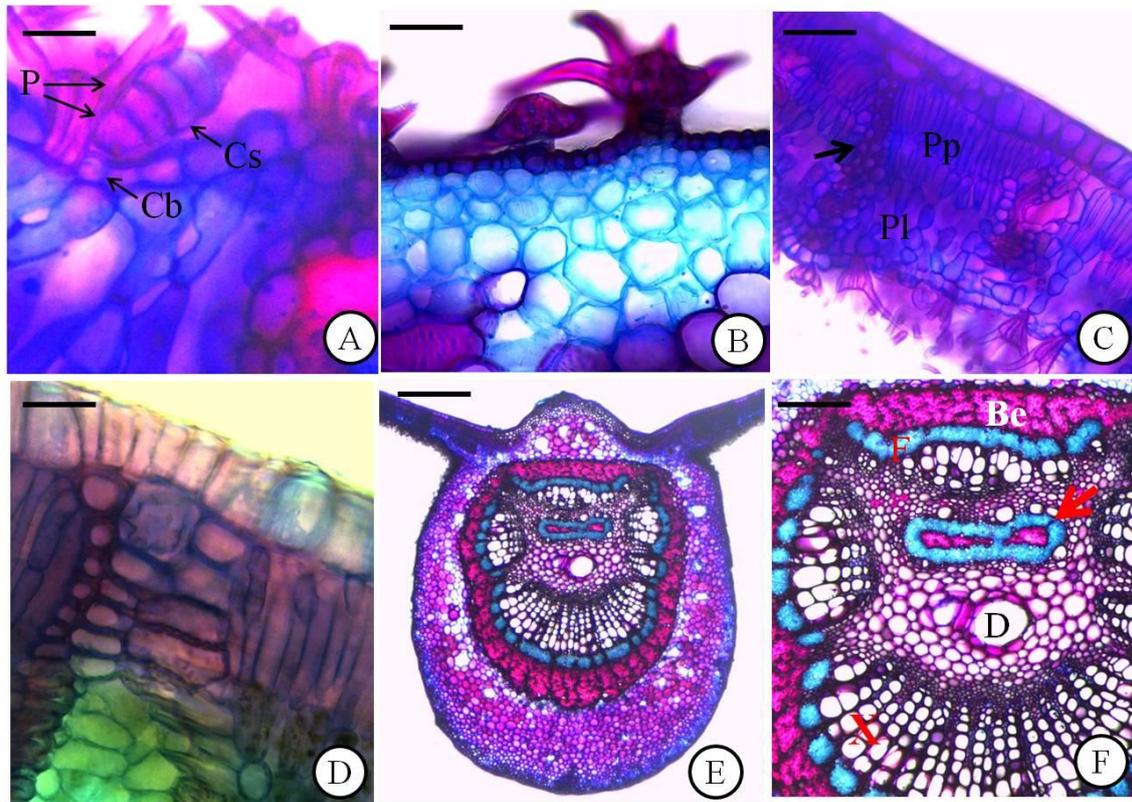


FIGURA 1. Secções transversais do limbo foliar de *T. speciosum*. A: Aspecto da epiderme evidenciando, tricoma glandular do tipo claviforme, constituído por célula basal (Cb), pedúnculo bicelular (P) e células secretoras (Cs). B: Tricoma estrelado pendunculado, notar a elevação no centro. C: Constituição do mesofilo, mostrando a estratificação dos parênquimas paliádico (Pp) e lacunoso (Pl). Destaque para epiderme unisseriada e extensão da bainha parenquimática e esclerenquimática (seta preta). D: Idioblasto cristalífero em secção transversal. E: Aspecto geral da Nervura central. F: Sistema vascular envolto por bainha esclerenquimática (Be), com arranjo em anel encerrando um feixe acessório na medula (seta), notar a ocorrência de ducto secretor (D) na

porção central. X: xilema, F: floema. Barras: A: 40 μm ; B e C: 50 μm ; D: 80 μm ; E: 110 μm ; F: 60 μm .

A constituição do mesofilo das folhas variou com o ambiente. Ambas as plantas apresentam parênquima paliçádico formado por uma camada de células, contudo as plantas expostas a pleno sol apresentam células mais alongadas (Fig. 2A). O parênquima lacunoso também se diferencia, nas folhas de sol apresenta muitas camadas de células com poucos espaços intercelulares, enquanto que as folhas de sombra apresentam células com muitos espaços intercelulares (Fig. 2B). As espessuras médias de ambos os tecidos apresentaram diferenças significativas, enquanto os parênquimas paliçádico e lacunoso de plantas de sol apresentaram espessura média entre 392,22 e 429,85 μm , já os tecidos das plantas de sombra apresentaram médias entre 238,40 e 228,15 μm , respectivamente (Tabela 1).

TABELA 1. Espessura da nervura central (NC), feixe vascular (FV), mesofilo (MS), parênquima paliçádico (PP) e parênquima lacunoso (PL), em folhas de *T. speciosum* de pastagem (P) e de floresta ombrófila densa (F).

	NC (μm)	FV (μm)	MS (μm)	PP (μm)	PL (μm)
Folha de Sol (P)	2003,19 a	264,33 a	321,04 a	392,22 a	429,85 a
Folha de Sombra (F)	1516,67 b	166,91 b	206,54 b	238,40 b	228,15 b
CV (%)	7,89	12,19	10,88	6,58	24,74

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

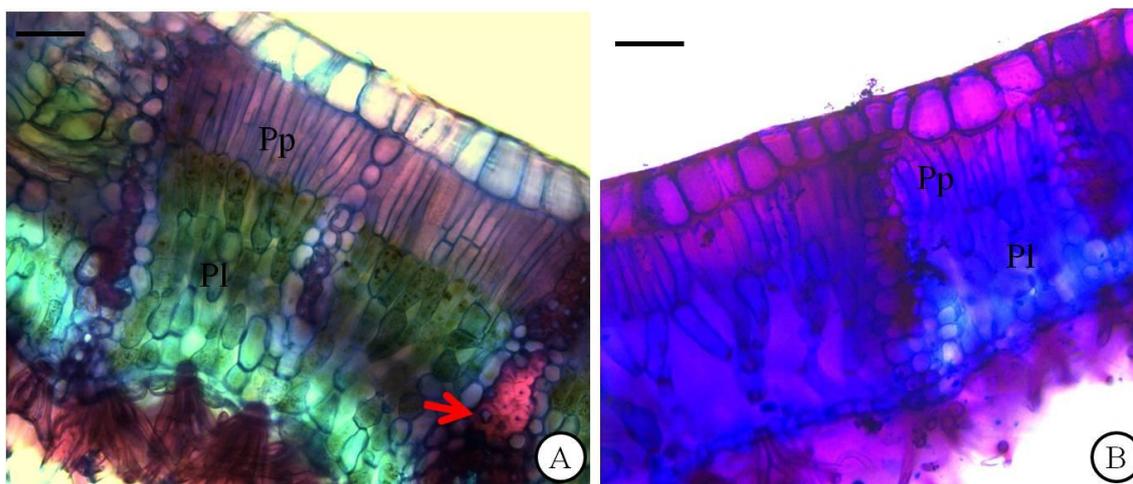


FIGURA 2. Secções transversais da folha de *T. speciosum*. A: Mesofilo de folhas das plantas de ambiente a pleno sol, com feixes vasculares colaterais (seta). B: Mesofilo de folhas das plantas de ambiente sombreado. (Pl- Parênquima lacunoso; Pp- Parênquima paliçádico). Barras: A e B: 70 μ m.

Segundo Boeger & Wisniewski (2003), as folhas de árvores de florestas tropicais mais expostas à intensidade luminosa apresentam características xeromórficas, especialmente identificadas pelo parênquima paliçádico mais espesso, parênquima lacunoso com poucos espaços intercelulares e alto grau de esclerofilia, como observado no presente estudo (Tabela 1 e Figura 2).

A maior espessura de parênquima paliçádico é importante para evitar a fotoinibição nas folhas com exposição a maior intensidade luminosa (TAIZ & ZEIGER, 2004). Isso permite que a luz seja transmitida mais diretamente, evitando o maior aproveitamento do excesso de luz que incide na porção superior da árvore (MAJEROWICZ, 2004).

A maior razão da área dos espaços do parênquima lacunoso pela área total deste mesmo parênquima em folíolos de sombra (Fig. 2B) permite um maior aproveitamento da luz incidente na porção inferior interna do indivíduo, uma vez que os espaços intercelulares geram interfaces ar-água, que refletem e refratam a luz possibilitando a difusão luminosa (MAJEROWICZ, 2004).

Outras características evidenciadas na Figura 2 é a presença em maior quantidade de tricomas nas folhas de sol e também maior espessura nos feixes vasculares colaterais (Fig. 2A), o que segundo Waldhoff & Furch (2002) também seriam especializações relacionadas à proteção, uma vez que os

tricomas mantêm uma atmosfera saturada em vapor de água em torno da folha e os feixes vasculares são considerados vias de transporte principalmente para a água (LARCHER, 2000).

O dendrograma dos indivíduos pelo método UPGMA (Fig. 3), indica a formação de dois grupos principais. O grupo I é composto pelas plantas do Parque Nacional do Juruena (Indivíduos 1 a 5), enquanto que as plantas de ambiente a pleno sol (Pastagem) foram alocadas no grupo II (Indivíduos 6 a 10).

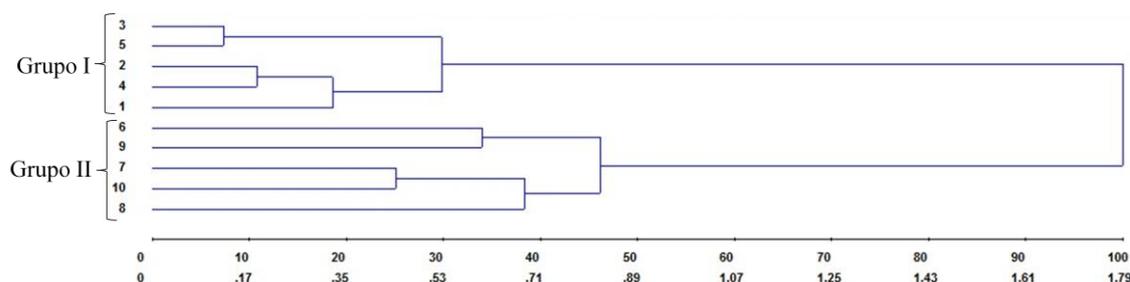


FIGURA 3. Dendrograma representativo do padrão de dissimilaridade entre os 10 indivíduos de *T. speciosum*, obtido pelo Método de Agrupamento de Ligação Média entre Grupos (UPGMA) com base na Distância Euclidiana média padronizada, estimada a partir de 5 características anatômicas quantitativas.

A característica quantitativa que mais contribuiu para a explicação da divergência anatômica entre as plantas de sol e de sombra foi a espessura da nervura central (69%) (Tabela 2), as plantas de sol apresentaram uma média de 2003,19 μm , enquanto as plantas de sombra 1516,67 (Tabela 1). Esse fato corrobora com a observação feita por Eschrich (1995), de que os órgãos foliares melhor vascularizados (plantas de ambiente a pleno sol), tornam-se mais aptos a enfrentarem deficiências hídricas. Contudo, Gomes (1992) aponta que alguns estudos com espécies lenhosas indicam que mesmo aquelas plantas que na fase adulta são essencialmente heliófilas, apresentam um crescimento insatisfatório quando plantadas a pleno sol.

TABELA 2. Contribuição relativa das cinco características quantitativas avaliadas para a divergência anatômica foliar em 10 indivíduos de *T. speciosum*.

Característica	Contribuição (%)
Nervura Central	69,05
Parênquima lacunoso	12,08
Parênquima paliçádico	7,95
Feixe vascular	6,82
Mesofilo	4,10
TOTAL	100,00

O agrupamento de plantas de sol e plantas de sombra em grupos distintos demonstrou alterações anatômicas significativas ocasionadas pelas variações da intensidade luminosa sobre as folhas, o que evidenciou grande capacidade adaptativa de *T. speciosum*, uma vez que tal plasticidade permite a sobrevivência da espécie em ambientes diversos. Para o ambiente florestal, tal característica é fundamental, dada à dinâmica da floresta, e também justifica o desenvolvimento da espécie em áreas de pastagem.

A plasticidade fenotípica é a capacidade que alguns genótipos possuem de responder a alterações do meio ambiente em que se encontram, modificando a sua expressão fenotípica, mediante ajustamentos morfológicas ou fisiológicas (SCHLICHTING, 1986). No entanto, o seu maior interesse está relacionado com a possibilidade da plasticidade incluir também processos ativos de adaptação ao stress ambiental, um aspecto fundamental para garantir a estabilidade das populações perante as alterações globais do clima, especialmente importante no caso das árvores, que são organismos de grande longevidade, associada a uma reprodução tardia e incapazes de se deslocarem para zonas de clima mais favorável (SULTAN, 2000).

A capacidade adaptativa diante de diferentes condições de luminosidade evidencia que esta espécie pode obter sucesso em ambientes a céu aberto e sob cobertura, podendo inclusive ser usada em projetos de reflorestamento ou ainda em consórcio com outras espécies mais exigentes com relação à quantidade de luz. Contudo, são necessárias ainda, pesquisas que avaliem a germinação da espécie sob estresse hídrico, para verificar sua resiliência a ambientes secos, uma vez que os indivíduos isolados na

pastagem, ora analisados, são provavelmente resultado de fragmentação florestal.

Conclusões

- A epiderme das folhas de *T. speciosum* é unisseriada, o mesofilo dorsiventral, entretanto os parênquimas são pouco distintos, foram observados tricomas glandulares do tipo claviforme e tricomas estrelados sésseis.
- Feixes vasculares colaterais estão dispersos no mesofilo, formando bainhas que se estendem até as epidermes. A nervura central, em secção transversal, possui formato biconvexo, com sistema vascular fechado e envolto por bainha esclerenquimática.
- A constituição do mesofilo das folhas variou com o ambiente, plantas expostas a pleno sol apresentaram células mais alongadas no parênquima paliçádico, parênquima lacunoso com mais camadas e maior quantidade de tricomas, enquanto que as folhas de sombra apresentaram células com muitos espaços intercelulares no mesofilo.
- A espécie demonstrou capacidade adaptativa diante de diferentes condições de luminosidade, o que justifica estratégias de conservação in situ e ex situ.

Referências Bibliográficas

AGUIAR, T. V. et al. Anati quanti: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**, v.25, n.4, p.649-659, 2007.

BECK, C. B. **An Introduction to Plant Structure and Development Plant**. Anatomy for the Twenty-First Century. Second Edition. Cambridge University Press, New York, 2010. 150 p.

BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.

BOSABALIDIS, A. M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive Cultivars. **Plant Science**, v. 163, p. 375-379, 2002.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Divergência genética. In: _____. (Ed.) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Ed. da UFV, 2001. p. 287-324.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa: Ed. da UFV, 2006. 220 p.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United State National Herbarium**, v. 35, p. 579-614, 1964.

CUTTER, E. G. **Plant anatomy: Cells and Tissues Part I**, London. William Clowes and Sons, p. 315-319, 1978.

DICKISON, W. C. **Integrative Pant Anatomy**. Burlington, USA: Academic Press, 2000. 180 p.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução: Berta Lange de Morretes. Brasil: Edgard Bücher., 1974. 550 p.

ESCHRICH W. **Funktionelle Pflanzenanatomie**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 250 p.

FEARNSIDE, P. M. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. **Environmental Conservation**, v. 28, p. 23-38, 2001.

FERREIRA, J. C. V. **Mato Grosso e seus Municípios**. Cuiabá: Secretaria de Estado da Educação. 2001. 365p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: Formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 61-71, 2005.

GARCIA, T. B. **Anatomia dos órgãos vegetativos aéreos de três espécies de *Theobroma* L. (Malvaceae) com ênfase nas estruturas secretoras: estrutura e histoquímica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Botânica Tropical) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Pará, Belém, 2012. 88 p.

GOMES, D. M. S. **Anatomia foliar de *Gomidesia spectabilis* (DC) Berg. E *G. nitida* (Vell.) Legr. (Myrtaceae).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992. 66 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique.** MacGraw-Hill Book Company, New York. 1940. 170 p.

KAISER, E. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Botanisch Zentralb**, v. 1880, p. 25-26, 1880.

KUBITZKI, K.; BAYER, C. **The Families and Genera of Vascular Plants. V. Flowering Plants. Dicotyledons. Malvales, Capparales and Non-betalain Caryophyllales.** Springer, Berlin. 2003. 550 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal.** Tradução: Carlos H. B. A. Prado. São Paulo: Rima, 2000. 213 p.

LAURANCE, W. F.; VASCONCELOS, H. L. Consequências ecológicas da fragmentação florestal na amazônia. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 3, p. 434-451, 2009.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2000. 190 p.

LÜTTGE, U. **Physiological ecology of tropical plants.** Springer-Verlag, Berlin, 1997. 130 p.

MAJEROWICZ, N. **Fotossíntese.** In: KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004. p. 200-233.

MARTINI, M. H.; LENCI, C. G.; FIGUEIRA, A.; TAVARES, D. Q. Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n.1, p. 147-154, 2008.

NAKAYAMA, L. H. I.; SOARES, M. K. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). **Scientia Agricola**, v. 53, n. 1, p. 44-52, 1996.

PNJU - PARQUE NACIONAL DO JURUENA. Disponível em: <<http://www.parquenacionaldojuruena.com.br>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

SANTOS, S. F. **Estrutura e histoquímica de sementes do gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2003. 77 p.

SCHLICHTING C. D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review of Ecology & Systematics**, 17, p. 667-693, 1986.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasílica**, v. 19, n.1, p. 183-194, 2005.

SULTAN S. E. Phenotypic plasticity for plant development, function, and life-history. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 537-542, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Artmed, Porto Alegre, 2004. 245 p.

WALDHOFF, D.; FURCH, B. Leaf morphology and anatomy in eleven tree species from Central Amazonian floodplains (Brazil). **Revista Amazoniana**, v. 17, n. 1, p. 79-94, 2002.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados encontrados neste trabalho permitem concluir que:

- A diversidade genética detectada na população de *T. speciosum* estudada encontra-se espacialmente estruturada dentro da população, logo o estabelecimento de unidades permanentes de conservação como o Parque Nacional do Juruena é uma ferramenta valiosa para preservar a diversidade genética entre os indivíduos de populações naturais.

- As populações de *T. speciosum* e *T. subincanum* demonstraram estar bem estabelecidas na área estudada e distribuídas com número de indivíduos significativo em todas as classes diamétricas, o que permite inferir que o estado de conservação das espécies é satisfatório e também elucidar a importância da manutenção de unidades de conservação como o Parque Nacional do Juruena.

- A constituição do mesofilo das folhas de *T. speciosum* variou com o ambiente, demonstrando certa plasticidade fenotípica, assim, pode obter sucesso em ambientes a céu aberto, podendo inclusive ser usada em projetos de reflorestamento, contudo, são necessárias ainda, pesquisas que avaliem a germinação da espécie sob estresse hídrico, para verificar sua resiliência a ambientes secos.