



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

RAÍSSA MARIA SAMPAIO DE PAIVA

**ASPECTOS LIMNOLÓGICOS E GENÉTICOS DA *Nymphaea rudgeana* G. Mey. EM
AMBIENTES AQUÁTICOS NA SAVANA DE RORAIMA**

Boa Vista, RR
2016

RAÍSSA MARIA SAMPAIO DE PAIVA

**ASPECTOS LIMNOLÓGICOS E GENÉTICOS DA *Nymphaea rudgeana* G. Mey. EM
AMBIENTES AQUÁTICOS NA SAVANA DE RORAIMA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Manejo e Conservação de Bacias Hidrográficas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucília Dias Pacobahyba

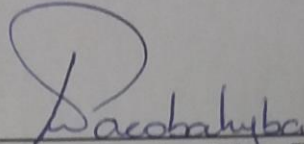
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Granja

Boa Vista, RR
2016

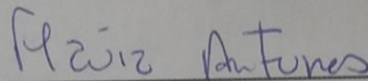
Raissa Maria Sampaio de Paiva

Aspectos limnológicos e genéticos da *Nymphaea rudgeana* G. Mey. em ambientes aquáticos na savana de Roraima

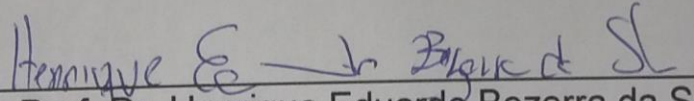
Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 25 de agosto de 2014 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



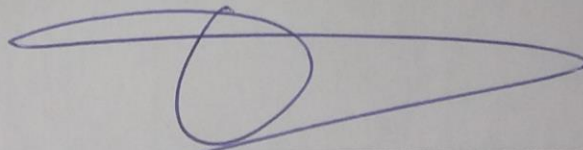
Profa. Dra. Lucilia Dias Pacobahyba
Orientadora – Universidade Federal de Roraima



Profa. Dra. Flavia Antunes
Membro – Universidade Estadual de Roraima



Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva
Membro – Universidade Federal de Roraima



Prof. Dr. Reinaldo Imbrozio Barbosa
Membro – INPA/RR

*Aos meus queridos avós Marcelino,
Marinete, Rida e Thamires.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado esta oportunidade, ter me guiado e me proporcionado esse complemento para a minha vida profissional.

A CAPES pela concessão da bolsa e a Universidade Federal de Roraima por todo apoio logístico para o desenvolvimento do trabalho. Ao Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PRONAT) pela infraestrutura disponibilizada para execução da pesquisa.

À minha orientadora e amiga Prof. Dr.^a Lucilia Dias Pacobahyba por ter acreditado no meu potencial desde o começo, ter me dado esta oportunidade e ter seguido sempre ao meu lado, além é claro da paciência, generosidade, ensinamentos, puxões de orelha fazendo com que eu sempre pudesse dar mais e mais de mim em todos os momentos e a quem eu devo todo meu início nesta profissão.

À minha co-orientadora e amiga Prof. Dr.^a Fabiana Granja por ter embarcado nesta ideia e ter feito de tudo pra que ela desse certo. Agradeço por todas as conversas, por todos os desabafos e por ter tido sempre paciência e me mostrado que eu posso mais do que eu imagino até quando eu mesma pensei em desistir. Seus ensinamentos e paixão pela Biologia molecular me fizeram ter o mesmo olhar sobre ela. Agradeço do fundo do meu coração!!

Ao técnico Márcio Teixeira pela sua imensa ajuda e experiência em campo facilitando todo o meu trabalho. Ao fotógrafo Roberto Caleffi por deixar esse trabalho mais bonito com suas belas fotografias.

A todo o quadro de professores do CBio e do PRONAT pelo aprendizado repassado durante todo esse período, em especial ao Prof. Dr. Luiz Alberto Pessoni por todos os momentos que me recebeu e não excitou em me ajudar, passando tudo o que sabe. A minha gratidão e admiração pelo senhor é enorme, obrigada!!

Ao Prof. Dr. Reinaldo Imbrozio sempre fazendo das nossas “discussões” de conhecimento um grande momento de aprendizado. Agradeço por todos os momentos que me recebeu, por toda a ajuda e tenha certeza que sempre terá em mim uma completa gratidão. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital pela disponibilidade em me fornecer tudo que eu precisei, sempre preocupado se estava me faltando algo e ao Prof. Dr. Henrique Bezerra por ter disponibilizado seu tempo sempre tirando todas as minhas dúvidas.

A técnica de laboratório Elenilda Rebouça por ter dedicado parte do seu tempo em me ensinar o que sabia. Agradeço por esses momentos.

Aos meus queridos amigos Flávia Michelle Duarte, Lorrane Feitoza, Aline Gondim, Eduardo Brito, Maria Aparecida Marinho, Daisy Oliva, por ter compartilhado todos os momentos dessa vida acadêmica. Aqui vai um pedacinho de alguns de vocês.

À equipe do laboratório de Ecologia Vegetal pelos momentos compartilhados durante as coletas e análises... sem vocês eu demoraria meses para fazer tudo. Obrigada!

À equipe do laboratório de Biologia Molecular sempre me mostrando outra visão e permitindo uma troca de experiências incríveis... esses momentos valem ouro!

A um amigo especial Edson Gomes de Moura-Junior pelos grandes ensinamentos, questionamentos e ajuda na melhoria deste trabalho e pelas parcerias realizadas. Agradeço imensamente por tudo!

À Aline Lopes do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela oportunidade de me receber e sempre me mostrar que o mundo das macrófitas é algo fantástico.

A uma grande equipe do INPA que mudou a vida de todos em sua passagem por Boa Vista e em especial ao Pedro Aurélio Lima e a Juliana Schiatti por toda a paciência e ajuda neste pequeno espaço de tempo.

A toda minha família, em especial aos meus avós, meu pai e minha mãe, meu irmão, minhas tias e meus tios por ter fornecido carinho, amor, compreensão e apoio durante toda esta caminhada. Seus ensinamentos fazem parte da minha vida e norteiam os meus princípios.

Agradeço a todos que contribuíram para realização deste trabalho e que não me lembrei neste pequeno espaço de tempo. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos!!!

Muito obrigada a todos!!!

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”. (Carl Sagan)

RESUMO

O estudo da diversidade genética têm auxiliado pesquisadores a definir e entender a biologia e a estrutura das populações, bem como a revelar possíveis variações biológicas decorrentes de alterações nas condições ambientais, podendo assim, elaborar planos de conservação a longo prazo. No estado de Roraima, uma das espécies mais frequentes nos corpos d'água é a *Nymphaea rudgeana* G. Mey. que do ponto de vista ecológico é considerada bioindicadora de ambientes pouco impactados ou não poluídos. Diante disso, o presente estudo teve como finalidade estabelecer possíveis relações entre os fatores limnológicos e a variabilidade genética da *N. rudgeana* em lagos e igarapés de áreas de savana do Estado. As coletas foram realizadas em quatro lagos e quatro igarapés distribuídos em um raio de 50 km ao redor da cidade de Boa Vista. As amostras abióticas (variáveis limnológicas) foram coletadas no período de julho de 2013 a abril de 2014, sendo determinados os seguintes parâmetros: pH, oxigênio dissolvido, nitrato, nitrito, amônia, alcalinidade, ortofosfato, condutividade elétrica e profundidade. No mês de novembro de 2013, foram coletadas folhas jovens para análise genética através de marcadores ISSR em 24 indivíduos distribuídos nas oito populações. A análise do teste t de Student indicou diferenças significativas ($p < 0.05$) quanto aos valores de pH, condutividade elétrica, amônia, ortofosfato e profundidade entre os igarapés e lagos analisados. Na análise genética, foram utilizados três iniciadores ISSR que geraram um total de 45 fragmentos amplificados com 94,8% de polimorfismo. A AMOVA demonstrou que houve uma porcentagem semelhante da variabilidade genética entre e dentro das populações, porém, a maior parte da variação se encontra dentro das populações (52,09%), enquanto 47,91% é decorrente de variabilidade interpopulacional. O teste de Mantel apontou que não houve uma correlação significativa das distâncias geográficas com as distâncias genéticas estimadas ($r = 0,53$; $p = 0,085$) e nem com as distâncias ambientais estimadas ($r = -0,23$; $p = 0,682$) entre os parâmetros limnológicos. A análise de agrupamento (UPGMA) mostrou a formação de dois grupos que uniu a maior parte dos indivíduos das regiões Norte, Oeste e Leste separando-os dos da região Sul. Ao relacionar esses dados com a composição limnológica notou-se que houve essa mesma separação devido a um gradiente ambiental relacionado com a diminuição da alcalinidade e do nitrato e um aumento nas concentrações de nitrito e fosfato. A partir dos resultados observados, podemos inferir que a separação desses dois grupos ocorreu devido a fatores ambientais e a impactos antrópicos que podem estar favorecendo a diferenciação de genótipos ao longo do gradiente encontrado, já que o aumento ou a diminuição destes elementos pode atuar como um fator limitante a produção primária das plantas, além de serem essenciais na formação de moléculas. Estudos mais detalhados são necessários para confirmar esta relação.

Palavras-chave: ISSR. Macrófitas aquáticas. Variáveis limnológicas.

ABSTRACT

The study of genetic diversity has helped researchers to define, and understand, the biology structure of the population, as well as revealing possible biological variations due to changes in environmental conditions, thus being possible to draw up plans for long-term preservation. In Roraima state, one of the most frequent species in the water bodies is the *Nymphaea rudgeana* G.Mey., which by the ecological point of view is considered to be a bioindicator of little impacted or de-polluted environments. Therefore, the present study aims to establish possible relationships between limnological factors and genetic variability of *N. rudgeana* in lakes and streams in savanna areas of the state. The samples were collected in four lakes and four streams distributed in a radius of 50km around the city of Boa Vista. The abiotic samples (limnological variables) were collected from July 2013 to April 2014, being determined the following parameters: pH, dissolved oxygen, nitrate, nitrite, ammonia, alkalinity, orthophosphate, electrical conductivity and depth. In November 2013, young leaves were collected for genetic analysis by ISSR markers in 24 individuals distributed in eight populations. The analysis of Student's t-test indicated significant differences ($p < 0.05$), for the pH, electrical conductivity, ammonia, orthophosphate and depth ratings between the streams and lakes analyzed. In genetic analysis, three ISSR indicators were used, which generated a total of 45 fragments amplified with 94.8% polymorphism. The AMOVA showed that there was a similar percentage of the genetic variability within and among populations, but most of the variation is found within populations (52.09%), while 47.91% is due to interpopulation variability. The Mantel test showed that there was no significant correlation between geographical distances and estimated genetic distances ($r = 0.53, p = 0.085$) nor with the estimated environmental distances ($r = -0.23, p = 0.682$) between limnological parameters. Cluster analysis (UPGMA) showed the formation of two groups that united most of the individuals in the North, West and East sides separating them from the South side. By linking these data with the limnological composition it is noticed that there was this same separation occurring due to the associated environmental gradient with decreasing alkalinity and nitrate in the water samples and an increase in the concentrations of nitrite and phosphate. From the observed results, we can infer that the separation of these two groups occurred because of environmental factors and human impacts that may favor the differentiation of genotypes found along the gradient, since the increase or decrease of these elements can act as a limiting factor in primary production plants and are essential in the formation of molecules. More detailed studies are needed to confirm this relationship.

Keywords: ISSR. Macrophytes. Limnological variables.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Folhas flutuantes de <i>N. rudgeana</i> com destaque para a sua flor aberta	14
Figura 2 -	Área de estudo selecionada nos municípios de Boa Vista, Bonfim e Cantá ..	19
Figura 3 -	Registro fotográfico de cada ambiente de estudo.....	21
Figura 4 -	Padrão do gel de agarose (1,2%) com o perfil dos fragmentos produzidos pelos indivíduos de <i>N. rudgeana</i>	32
Figura 5 -	Coefficiente de correlação do número ótimo de marcadores de DNA para <i>N. rudgeana</i>	34
Figura 6 -	Projeção gráfica das estimativas de distância de dissimilaridade dos 24 acessos de <i>N. rudgeana</i> analisados por ISSR	36
Figura 7 -	Agrupamento UPGMA dos 24 acessos de <i>N. rudgeana</i> gerados a partir da matriz de distância de Nei e Li (1979)	38
Figura 8 -	Representação gráfica da Análise de Componentes Principais (PCA) da composição limnológica	40
Figura 9 -	Relação entre a composição genética baseada em marcadores ISSR (expressa pelo valor do primeiro eixo da PCoA) da <i>N. rudgeana</i> com a composição limnológica (expressa pelo valor do primeiro eixo da PCA). Ig = Igarapé; Lg = Lago	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de folhas coletadas nos igarapés e lagos selecionados e suas respectivas identificações (ID)	23
Tabela 2 - Amostras selecionadas para a amplificação com seus respectivos graus de pureza e a sua concentração	24
Tabela 3 - Valores médios das variáveis limnológicas analisadas em cada ambiente de estudo	28
Tabela 4 - Iniciadores utilizados com suas respectivas temperaturas de anelamento ($T_A^{\circ}\text{C}$), número de locos produzidos e porcentagem de polimorfismo	31
Tabela 5 - AMOVA das oito populações de <i>N. rudgeana</i> . GL = graus de liberdade. SQ = soma dos quadrados dos desvios. GM = quadrado médio	35
Tabela 6 - Correlação dos parâmetros limnológicos com o eixo 1 da análise de componentes principais (PCA)	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AMOVA	Análise de Variância Molecular
CBio	Centro de Estudos da Biodiversidade
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
E	Valor de Estresse
ISSR	<i>Inter-Simple Sequence Repeat</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCoA	<i>Principal Coordinates Analysis</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPBio	Programa de Pesquisa em Biodiversidade
PRONAT	Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRR	Universidade Federal de Roraima
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	ÁREA DE ESTUDO	18
3.2	CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS AMBIENTES DE ESTUDO	20
3.3	PERÍODO DE AMOSTRAGEM	22
3.4	VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS	22
3.5	MÉTODOS DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	22
3.6	MÉTODOS DE COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL GENÉTICO	23
3.6.1	Extração de DNA	23
3.6.2	3.5.2 Quantificação do DNA por espectrofotometria	24
3.6.3	3.5.3 Análise molecular	25
3.6.4	3.5.4 Eletroforese	25
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS AMOSTRAS	25
3.7.1	Identificação do número ótimo de marcas	26
3.7.2	Análise de variância molecular	26
3.7.3	Projeção gráfica das distâncias e análise de agrupamento	26
3.7.4	Distâncias geográficas	27
3.7.5	Análise de ordenação	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS	28
4.2	COMPOSIÇÃO GENÉTICA	31
4.2.1	Padrões e aspectos dos iniciadores ISSR	31
4.2.2	Número ótimo de marcas	33
4.2.3	Estrutura genética	35

4.3	RELAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA COM AS VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS	39
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE	51

1 INTRODUÇÃO

No estado de Roraima, existe uma variedade de corpos d'água com características próprias e uma das espécies vegetais mais frequentes nestes ecossistemas é a *Nymphaea rudgeana* G. Mey. (Figura 1) que pertence ao subg. *Hydrocallis*, possui suas folhas elípticas à sub-orbicular, e se distingue das demais pelas margens das folhas profundamente denteadas. As suas flores têm de 8 a 15 cm de diâmetro, e, ocasionalmente, abrem em torno da meia-noite, geralmente permanecendo apenas com as sépalas abertas. As pétalas são de cor de neve ou creme ou verde-branco e os estames são amarelo pálido como são as anteras (BOVE; PAZ, 2009). A planta que é formada por rizoma é semelhante a uma lâmpada, sem ramificação. A estrutura subterrânea do indivíduo desenvolve formação de folhas, flores e raízes (CAMARGO; FLORENTINO, 2000).

Figura 1 – Folhas flutuantes de *N. rudgeana* com destaque para a sua flor aberta



Foto: R. C. Caleffi

Em relação a sua distribuição, esta espécie habita áreas da América Central, Antilhas, norte e leste da América do Sul. No Brasil, ocorrem nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste (BOVE; PAZ, 2009).

Segundo Wiersema (1987) esta espécie se reproduz via semente, produzida por uma auto-polinização, que pode ser dispersa pelo fluxo da água ou através de animais, peixes e aves aquáticas (SANTAMARÍA, 2002). Porém, não existe nenhum estudo que quantifique as taxas de polinização e de reprodução desta espécie.

Entre as poucas pesquisas realizadas com este táxon podemos destacar o trabalho de campo de Prance e Anderson (1976) que observaram aspectos da biologia floral e o de Camargo e Florentino (2000) que estudaram a dinâmica populacional e estimaram a produção primária líquida da macrófita em um braço do rio Itanhaém (Estado de São Paulo, Brasil).

Porém, pesquisas com um enfoque molecular não foram realizadas até hoje com esta espécie. Entre os trabalhos com representantes do gênero *Nymphaea* podemos citar o de Chaveerach, Tanee e Sudmoon (2011) que efetuaram um estudo de identificação molecular para o gênero que têm grande importância ornamental para lagos e aquários, concluindo que os marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) foram extremamente sensíveis e diferenciaram populações naturais de cultivares.

Entretanto, nos últimos anos, as análises de genética molecular têm auxiliado pesquisadores a definir e entender a biologia e a estrutura das populações, bem como a revelar possíveis variações biológicas decorrentes de alterações nas condições ambientais, podendo assim, elaborar planos de conservação a longo prazo. Conhecer os padrões de variabilidade genética entre e dentro das populações é um valioso instrumento que poderá ajudar na adoção de práticas mais eficientes para estes programas.

Usualmente, a análise da diversidade genética das populações está mais voltada para a distribuição dos níveis de variabilidade mantida dentro das populações e como esta se divide entre e dentro das mesmas (HAMRICK, 1983).

Raramente, populações naturais de plantas são compostas de alelos distribuídos aleatoriamente, mas que refletem um complexo mosaico de genótipos (SANTOS, 2011). A abundância relativa desses genótipos não é fixa, mas pode variar ao longo do ciclo de vida da espécie. Assim, as populações naturais de plantas são geneticamente estruturadas no tempo e no espaço (HOSSAERT-MCKEY et al., 1996).

Ao longo do tempo a variabilidade e estrutura genética das populações são resultantes da reprodução, da dispersão e da sobrevivência dos indivíduos de uma população. Portanto, é importante mesclar o conhecimento do sistema de acasalamento e reprodução, a história de vida e os fatores ecológicos, pois os mesmos têm papéis importantes na dinâmica evolutiva e ecológica das populações (LOVELESS; HAMRICK; FOSTER, 1998), podendo assim, entender a adaptação das populações a mudanças ambientais (CAVALLARI, 2004).

No entanto, indivíduos que têm maior poder adaptativo são favorecidos no processo de seleção natural, respondendo de forma positiva as adversidades levando a mudanças na constituição genética das populações naturais. Entretanto, mudanças que não se relacionam ao poder adaptativo podem se acumular e se fixar, levando a diferenças genéticas entre as populações que não se expressam fenotipicamente (SOUSA, 2001).

Pela ótica populacional, a distância geográfica e o sistema de cruzamento contribuem para maior parte da variabilidade genética dentro das populações. Espécies alógamas possuem maior variação genética dentro de suas populações, que espécies autógamas (HAMRICK; GODT, 1989).

A diminuição na variabilidade pode predispor as espécies uma redução na capacidade adaptativa. Assim, a variação pode ser vista como fundamental para a sustentabilidade e estabilidade do ecossistema (BARREIRA et al., 2006).

Entre alguns estudos realizados sob essa perspectiva com plantas aquáticas podemos destacar o de Han et al. (2007) que estima a variabilidade genética e a diversidade clonal de *Nelumbo nucifera* Gaertn. em populações na China e alguns que abordam a associação entre a variabilidade genética e as condições ambientais como o de Triest et al. (2010) que determinaram a diferenciação gênica de plantas aquáticas submersas em diferentes habitats apresentando uma relação dos genótipos com a temperatura e a salinidade da água, podendo assim, verificar possíveis impactos da ação do homem sobre o ambiente.

Diante disso, apesar de toda a importância ecológica das plantas aquáticas, incluindo as *Nymphaea*, são poucos os trabalhos que unem informações moleculares e ambientais a fim de trazer conhecimentos que permitam a identificação das espécies e que revelem variações biológicas em decorrência de modificações nas condições do meio, possibilitando assim, o reconhecimento de padrões de diversidade que podem estar correlacionados a fatores bióticos e abióticos ajudando a compreender os processos envolvidos nestas alterações (CESAR et al., 2005).

Este estudo procurou responder usando marcadores ISSR se a distribuição da variabilidade genética da *N. rudgeana* nos diferentes ambientes aquáticos (lagos e igarapés) em áreas de savana do estado de Roraima podem estar relacionada a um gradiente ambiental ligado aos fatores limnológicos.

2 OBJETIVOS

Os objetivos dessa pesquisa foram:

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a variabilidade genética da *N. rudgeana* em ambientes aquáticos de áreas de savana no estado de Roraima, associando-as com as variáveis limnológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as características limnológicas (potencial hidrogeniônico, oxigênio dissolvido, nitrato, nitrito, amônia, alcalinidade, ortofosfato, condutividade elétrica e profundidade) dos ambientes aquáticos amostrados;
- Analisar a variabilidade genética inter e intrapopulacional da *N. rudgeana* através de marcadores ISSR;
- Estimar as distâncias genéticas entre as populações e avaliar sua relação com a origem geográfica;
- Verificar possíveis influências dos fatores limnológicos sobre a variabilidade genética da *N. rudgeana*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em diferentes ambientes aquáticos (lagos e igarapés) localizados em áreas de savana nos municípios de Boa Vista, Bonfim e Cantá.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Os ambientes de amostragem foram selecionados em um raio de 50 km ao redor da cidade de Boa Vista, capital do Estado de Roraima, dentro da savana roraimense, sendo delimitados dois locais de coleta no sentido de cada ponto cardinal (Norte – Sul - Leste e Oeste), totalizando oito corpos de água (quatro igarapés e quatro lagos). O critério de escolha foi a presença da *N. rudgeana* e que os corpos aquáticos não tivessem nenhuma ligação entre si. A seleção dos ambientes foi realizada com o auxílio de imagens de satélite pelo *Google Earth* e de visitas prévias às áreas onde foram comprovadas que as mesmas possuíam os critérios estabelecidos (Figura 2).

Os ambientes definidos pertencem a propriedades particulares e áreas de estudo do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio), e as coletas somente foram realizadas após a concessão das autorizações dos proprietários e responsáveis pelas áreas.

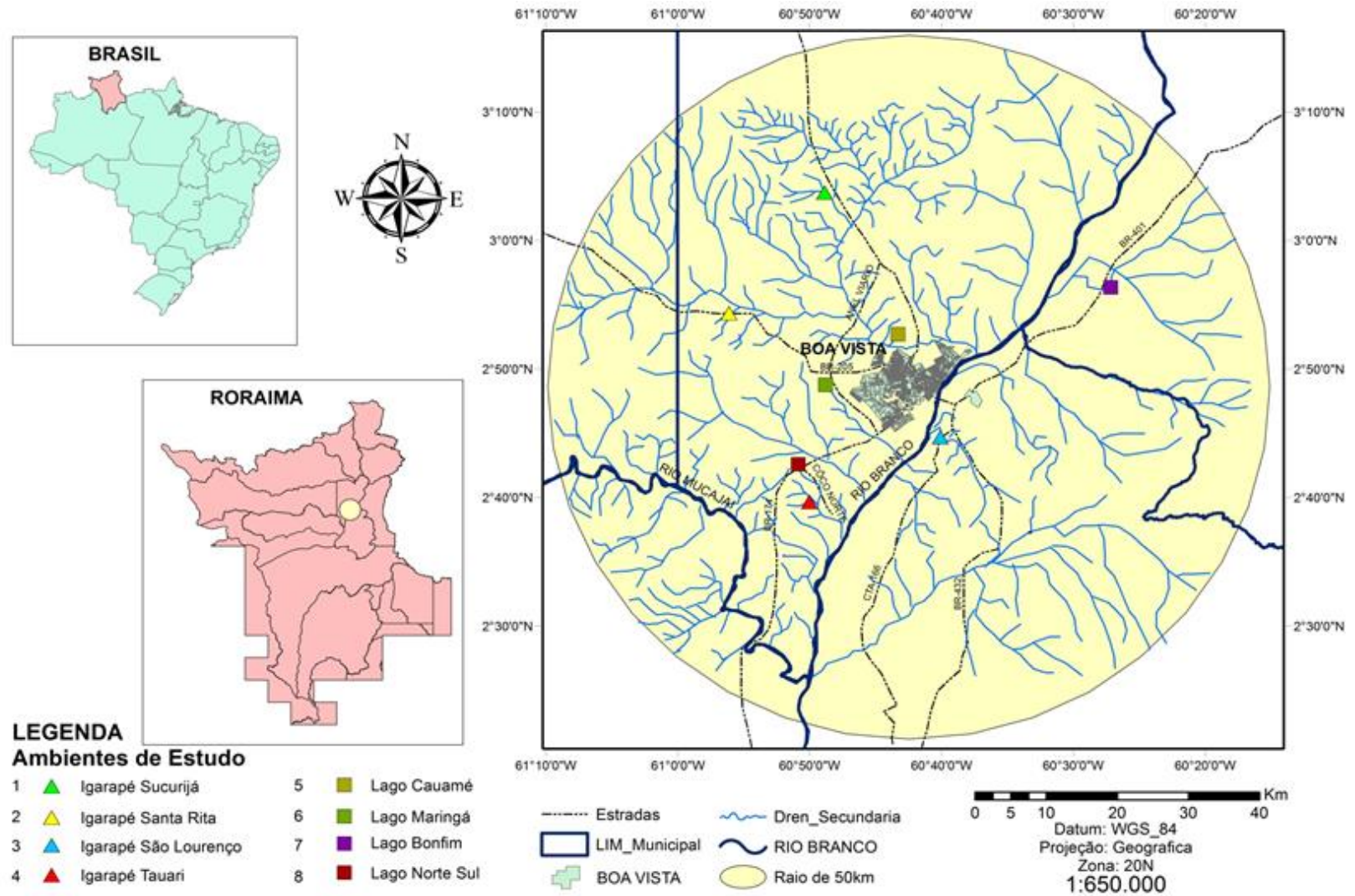
O igarapé São Lourenço foi considerado como parte do ponto cardinal Leste, devido à dificuldade de encontrar um igarapé de fácil acesso e que não pertencesse a terras indígenas.

Como forma de caracterizar cada município, consultamos as Informações Socioeconômicas de cada cidade, descrevendo-os nos parágrafos abaixo.

O município de Boa Vista possui o clima tropical úmido, apresentando estação chuvosa no verão. A precipitação média é de 1.750 milímetros anuais e a temperatura média anual é de 27,4° C. A vegetação é caracterizada por cobertura vegetal rasteira e descontínua característica do “lavrado” roraimense. Possui ocorrência de espécies arbóreas, predominando o caimbé (*Curatella americana* L.) nas partes mais altas. Outra característica da cobertura vegetal localiza-se nas galerias, ao longo da maior parte dos igarapés, que são marcadas pela presença do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e pelo buriti (*M. flexuosa*) (RORAIMA, 2010a).

Atravessando o Rio Branco, em sua margem esquerda encontra-se o município do Cantá que corresponde a 3,42% do território de Roraima. O clima é do tipo quente e semi-úmido com 5 a 6 meses secos. Possui uma composição vegetal onde a cobertura florestal é predominante sendo do tipo ombrófila densa e área de contato (formação pioneira/floresta), exibindo algumas áreas com manchas de savana do tipo parque (RORAIMA, 2010b).

Figura 2 – Área de estudo selecionada nos municípios de Boa Vista, Bonfim e Cantá



O município do Bonfim, distante 130 km do Cantá, possui o clima do tipo quente e semi-úmido e apresenta regiões de floresta estacional à ombrófila, possuindo algumas áreas de tensão ecológica compreendidas por savana (ecótono) (RORAIMA, 2010c).

3.2 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS AMBIENTES DE ESTUDO

Para auxiliar na caracterização dos ambientes amostrados, fichas de campo foram elaboradas contendo informações dos pontos de coleta como o nome do local, se existe presença de atividade humana próxima, tipo de vegetação nas margens, tipo de substrato, presença de animais, entre outros dados (APÊNDICE A). Também foram efetuados registros fotográficos, como pode ser observado na Figura 3.

As observações registradas nas fichas de campo sobre cada ambiente encontram-se abaixo:

- Ambiente 1: Igarapé Sucurijá, Município de Boa Vista.

Características: Localizado próximo ao Campus Agrotécnico da Universidade Federal de Roraima (UFRR). Rodeado por gramíneas, árvores e arbustos. Água turva com presença de plantas aquáticas.

- Ambiente 2: Igarapé Santa Rita, Município de Boa Vista.

Características: Encontra-se em área de agricultura e pecuária. Rodeado por mata ciliar com presença de buritis. Água transparente com plantas aquáticas e com pouca correnteza.

- Ambiente 3: Igarapé São Lorenzo, Município do Cantá.

Características: Encontra-se próximo a área de plantação da *Acacia mangium* Willd. Possui fragmentos de mata ciliar em suas margens e exibe erosão. A água apresenta forte correnteza com aspecto transparente a turvo.

- Ambiente 4: Igarapé Tauarí, Município de Boa Vista.

Características: Encontra-se em área de agricultura. Rodeado por mata ciliar e gramíneas. Água transparente com presença de plantas aquáticas e correnteza.

- Ambiente 5: Lago do Cauamé, Município de Boa Vista.

Características: Lago com barragem rodeado por gramíneas. Localizado na área de estudo do PPBio. A água é transparente com muitas plantas aquáticas.

- Ambiente 6: Lago Maringá, Município de Boa Vista

Características: Encontra-se em área de pecuária e próximo a estradas. Rodeado por gramíneas. Água turva.

Figura 3 – Registro fotográfico de cada ambiente de estudo

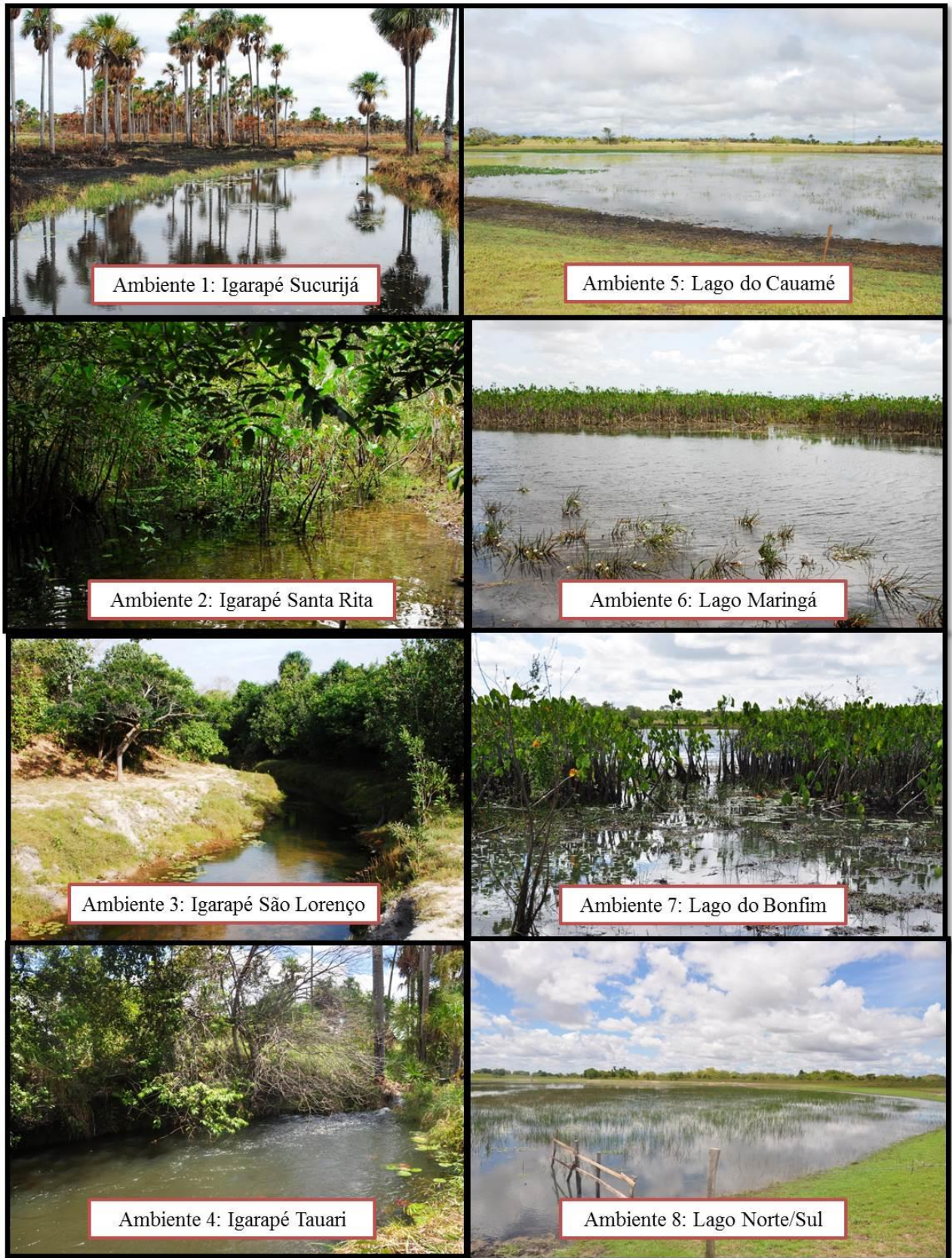


Foto: R. C. Caleffi

- Ambiente 7: Lago do Bonfim, Município do Bonfim.

Características: Encontra-se em área de pecuária intensiva, rodeado por gramíneas, arbustos e árvores característicos de áreas de savana. A água é transparente com muitas plantas aquáticas.

- Ambiente 8: Lago Norte/Sul, Município de Boa Vista.

Características: Encontra-se em área de pecuária intensiva. Rodeado por gramíneas. Água transparente com presença de plantas aquáticas.

3.3 PERÍODO DE AMOSTRAGEM

As amostras abióticas (variáveis limnológicas) foram coletadas mensalmente no período de julho de 2013 a abril de 2014 e as amostras bióticas (folhas) foram coletadas no mês de novembro de 2013.

3.4 VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS

As amostras de água foram coletadas em garrafas de polietileno de 350 mL nos mesmos pontos de coleta das folhas de *N. rudgeana*, e foram transportadas em ambiente refrigerado até o Laboratório de Ecologia Vegetal do Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio- UFRR).

Os parâmetros avaliados em laboratório foram: pH, oxigênio dissolvido, nitrato, nitrito, amônia, alcalinidade e ortofosfato, seguindo as metodologias indicadas pelo *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Os nutrientes foram quantificados através do espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu).

A variável condutividade elétrica foi medida *in situ* pelo aparelho Waterproof pH/CON 10 metros (Oakton). A medida de profundidade foi realizada utilizando-se um amostrador graduado feito de cano de PVC.

Para verificar se ocorreram diferenças significativas quanto aos valores das variáveis abióticas entre os igarapés e lagos analisados foi utilizado o teste t de Student através do programa estatístico BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

3.5 MÉTODOS DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Amostras da macrófita aquática foram coletadas separadamente com auxílio de tesoura de poda e herborizadas segundo a metodologia tradicional utilizada para plantas terrestres (ROTTA; BELTRAMI; ZONTA, 2008). As mesmas foram depositadas na coleção do Herbário – UFRR com os respectivos números de identificação: 3946, 3947, 3948, 3949,

3950, 3951, 3952 e 3953. Duplicatas foram enviadas para o Herbário BHCB - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo confirmada a identificação pelo especialista Marco Otávio Dias Pivari (UFMG).

3.6 MÉTODOS DE COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL GENÉTICO

Inicialmente, no mês de novembro de 2013 foram coletadas cinco exemplares de folhas jovens de cada população de *N. rudgeana* presente nos oito ecossistemas aquáticos, totalizando 40 amostras. Cada folha foi identificada por um número de acordo com o local no qual foi coletada como é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Amostras de folhas coletadas nos igarapés e lagos selecionados e suas respectivas identificações (ID)

ID das amostras	Local de coleta
1A - 1E	Igarapé Sucurijá
2A - 2E	Igarapé Santa Rita
3A - 3E	Igarapé São Lourenço
4A - 4E	Igarapé Tauari
5A - 5E	Lago Cauamé
6A - 6E	Lago Maringá
7A - 7E	Lago Bonfim
8A - 8E	Lago Norte-Sul

As amostras foram lavadas três vezes com água destilada alternando com uma única lavagem com água corrente ainda em campo, até a retirada de todas as impurezas e armazenadas em sacos plásticos individuais com fecho hermético, sendo transportadas até o Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PRONAT), aonde foram conservadas em freezer à -70°C até o momento da realização das extrações.

3.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA iniciou-se seguindo o protocolo CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) (ROMANO; BRASILEIRO, 1999) modificado por Paiva et al. (2014). As principais modificações foram: ausência de nitrogênio líquido, utilização de almofariz

previamente congelado a -70°C e adição de proteinase K a uma concentração final de $50\mu\text{g/ml}$ ao protocolo tradicional. Estas alterações permitiram a obtenção do material genético de boa qualidade e quantidade suficiente, de plantas aquáticas, incluindo representantes do gênero *Nymphaea*.

3.6.2 Quantificação do DNA por espectrofotometria

A partir das amostras extraídas foi realizada a quantificação do DNA por espectrofotometria no aparelho CIRRUS 80 MB (FEMTO). Para este procedimento foram retiradas alíquotas de $3\mu\text{l}$ de cada amostra para a análise. A leitura das amostras foi realizada a 260 nm e 280 nm e a razão entre esses comprimentos de onda foi utilizada para determinar o grau de pureza. As três amostras que apresentaram melhor purificação foram utilizadas no processo de amplificação e são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Amostras selecionadas para a amplificação com seus respectivos graus de pureza e a sua concentração

Local	Amostra	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Razão 260/280 nm
Igarapé Sucurijá	1A	15162.6	1.71
	1B	25085.0	2.02
	1C	24601.1	1.73
Igarapé Santa Rita	2A	20032.1	1.87
	2B	26249.8	1.78
	2C	29328.6	1.73
Igarapé São Lourenço	3A	26474.4	1.89
	3B	11893.2	1.76
	3C	22579.2	1.60
Igarapé Tauari	4A	20662.1	1.66
	4B	35006.2	1.55
	4C	38662.2	1.81
Lago Cauamé	5A	13066.9	1.52
	5B	45981.6	1.66
	5C	40994.1	1.82
Lago Bonfim	6A	34912.7	1.71
	6B	53634.5	1.36
	6C	57038.4	1.20
Lago Maringá	7A	34598.0	1.63
	7B	35710.7	1.73
	7C	37293.7	1.72
Lago Norte-Sul	8A	40222.1	1.48
	8B	20383.3	1.47
	8C	48570.6	1.42

3.6.3 Análise molecular

Os espécimes de *N. rudgeana* foram analisados por marcadores ISSR pelo método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os iniciadores testados e as condições de amplificação foram baseadas no estudo de Woods et al. (2005), Chaveerach, Tanee e Sudmoon (2011) e Poczai et al. (2011) realizados com diversas espécies de *Nymphaea* e com alguns iniciadores desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica (coleção nº9).

Inicialmente, foram testados 35 iniciadores através de uma reação em gradiente dos quais 21 apresentaram amplificações. Em seguida, dentre os iniciadores testados com gradiente de temperatura foram selecionados três que apresentaram melhor quantidade e nitidez das bandas (Tabela 4), a fim de investigar uma diversidade inter e intrapopulacional da *N. rudgeana*.

O volume da reação foi de 25µl, constituído por: 20ng de DNA genômico, 5µM de iniciador, 10µM de dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2,0mM MgCl₂ e 0,8U Taq DNA polimerase.

A reação foi incubada a 95°C durante 3 min. para a desnaturação do DNA e a amplificação foi realizada com os seguintes ciclos térmicos: 35 ciclos de desnaturação de 1 min. a 94°C, 1 min. a temperatura de anelamento entre 46°C a 56°C de acordo com cada iniciador, 2 min. a 72°C, e 7 min. de extensão final a 72°C, utilizando um termociclador GenCycler (Biosystems).

3.6.4 Eletroforese

O volume total dos produtos amplificados foram misturados a 1,0µl de azul de bromofenol a 2% e com Blue Green Loading Dye I em uma proporção de 1:10 e aplicados no gel de agarose 1,2 %, submetidos a eletroforese por 2 horas e 30 minutos a 5V/cm.

A observação das amostras foi realizada com excitação por luz ultravioleta e através do registro fotográfico pelo equipamento MiniBIS Pro 16 (Uniscience).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS AMOSTRAS

A interpretação dos padrões de bandas exibidos pelos géis levou em consideração que as bandas geradas por um mesmo primer e que ocupam a mesma posição relativa referem-se a amplificação do mesmo fragmento de DNA, ou seja, pertencem ao mesmo loco gênico,

enquanto bandas ocupando posições relativas diferentes são de locos distintos (PESSONI, 2007).

A partir das bandas amplificadas, uma matriz binária (ausência = 0/ presença = 1) foi construída observando o número e a porcentagem de bandas polimórficas por iniciador, determinando assim, a quantidade de locos polimórficos para cada *primer*. A matriz gerada foi utilizada para realização das análises através do Programa GENES (CRUZ, 2001).

3.7.1 Identificação do número ótimo de marcas

O número mínimo de marcas necessárias para obter associações estáveis entre os indivíduos foi estimado através da análise de *bootstrap*. A similaridade genética para cada par de indivíduos foi realizada a partir de reamostragens de diferentes tamanhos, com 10.000 permutações. Através desta análise obteve-se as estimativas de correlação dos valores da matriz de similaridade com outras matrizes geradas com diferentes números de marcas e o valor de estresse (E) que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada devendo assumir um valor inferior a 0,05 (KRUSKAL, 1964).

3.7.2 Análise de variância molecular

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações da espécie foi estimada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseado no método de Excoffier, Smouse e Quattro (1992).

3.7.3 Projeção gráfica das distâncias e análise de agrupamento

A partir da matriz de distância obtida pelo complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979) foi realizada a projeção gráfica dos acessos no espaço tridimensional, a fim de refletir as distâncias originais em outra dimensão. A eficiência da projeção gráfica é estimada através do coeficiente de correlação, do grau de distorção e do coeficiente de estresse (CRUZ, 2006; CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

A mesma matriz de distância foi usada para construção do dendograma pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). Para verificar a consistência dos agrupamentos, foram utilizadas 1.000 permutações. O coeficiente de correlação cofenética também foi calculado para testar a adequação do padrão de agrupamento dos acessos.

3.7.4 Distâncias geográficas

Para verificar a correlação entre as distâncias geográficas e as distâncias genéticas estimadas pelo coeficiente de Nei e Li (1979), utilizou-se o teste de Mantel com 1.000 permutações pelo programa estatístico R.

3.7.5 Análise de ordenação

As análises que permitiram fazer a relação entre as variáveis limnológicas e a composição genética foram realizadas pelo programa estatístico R.

Primeiramente, foi realizada uma *Principal Coordinates Analysis* (PCoA) da matriz binária, com base na distância de Nei e Li (1979). Em seguida, os dados abióticos foram padronizados para terem médias iguais a zero e desvio padrão igual a um, de modo que todas tivessem o mesmo peso na análise. Esses dados foram utilizados para executar uma *Principal Component Analysis* (PCA) de acordo com Vasconcelos (2012).

Essas técnicas reduzem a variabilidade multidimensional de uma matriz em dois ou mais eixos de ordenação que irão representar tanto a diferenciação genética como a diferenciação ambiental (TELLES et al., 2001).

Os valores do primeiro eixo de cada análise foram utilizados para inferir uma possível correlação entre as variáveis limnológicas e a composição genética através de uma regressão. Os valores do eixo 1 da PCA das variáveis limnológicas foram logaritimizadas [$\log(X+2)$] para apresentar uma distribuição linear.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo são apresentados nos tópicos abaixo.

4.1 VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS

A análise do teste t de Student indicou diferenças significativas ($p < 0.05$) quanto aos valores de pH, condutividade elétrica, amônia, ortofosfato e profundidade entre os igarapés e lagos analisados (Tabela 3). Por outro lado, os valores de alcalinidade, oxigênio dissolvido, nitrato e nitrito não divergiram. Os valores brutos dos parâmetros limnológicos analisados no presente estudo estão apresentados no APÊNDICE B.

Tabela 3 - Valores médios das variáveis limnológicas analisadas em cada ambiente de estudo

Variáveis limnológicas	Igarapés (n=4)	Lagos (n=4)	P-value
	Média (min. - máx.)	Média (min. - máx.)	
pH	5.70 (5.0 - 7.0)	5.88 (5.0 - 7.0)	0.030
Alcalinidade (mg.L⁻¹)	7.84 (0.0 - 28.0)	8.70 (0.0 - 28.0)	0.301
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5.43 (3.2 - 10.0)	5.45 (1.5 - 7.8)	0.483
Condutividade elétrica (µS.cm⁻¹)	8.50 (4.4 - 26.6)	13.26 (5.9 - 68.6)	0.016
Nitrato (mg.L⁻¹)	0.18 (0.0 - 0.23)	0.16 (0.0 - 0.28)	0.142
Nitrogênio amoniacal (mg.L⁻¹)	0.13 (0.01 - 0.56)	0.27 (0.0 - 2.22)	0.028
Nitrito (mg.L⁻¹)	0.00 (0.0 - 0.01)	0.00 (0.0 - 0.02)	0.151
Ortofosfato (mg.L⁻¹)	0.79 (0.16 - 2.22)	0.55 (0.05 - 1.32)	0.008
Profundidade (m)	0.59 (0.1 - 1.3)	1.0 (0.1 - 1.8)	<0.0001

O potencial hidrogeniônico (pH) define o caráter ácido, básico ou neutro do ambiente, sendo um logaritmo inverso da concentração de íons de hidrogênios livres na água (WETZEL, 1981) e é expresso numa escala exponencial, por isso, pequenas diferenças nos números correspondem a grandes alterações da variável. Esteves (1998) ressalta que o pH é um dos mais importantes parâmetros, com uma complexidade de interpretação em razão do grande número de fatores que podem influenciar em seu valor, estando geralmente relacionado com os processos de decomposição e atividades fotossintéticas.

Os dados brutos de pH variaram entre 5,0 e 7,0 independente do ambiente de estudo, caracterizando ambientes ácidos a neutros. Meneses, Costa e Costa (2007), ao estudar alguns lagos do lavrado de Roraima encontrou valores de pH ácido, variando entre 5,0 e 6,0.

Segundo os autores, o pH pode aumentar devido ao excremento de animais que são ricos em nutrientes (N, P e K) que ao fertilizarem as águas, aceleram o metabolismo vegetal e promovem a proliferação da vegetação aquática em geral reduzindo a disponibilidade do gás carbônico (responsável pela acidificação) no meio hídrico (SCHAFFER, 1985; ESTEVES, 1998).

Em outro estudo realizado para corpos d'água lóticos na Bacia do Rio Branco, Fabré et al. (2002) encontraram valores de 6,2 a 7,4 para o Alto Rio Branco, que vai desde a formação do próprio rio até o norte da cidade de Caracará.

Em nosso estudo, pode atribuir-se os valores um pouco mais básicos de pH para os lagos (APÊNDICE B) devido a intensa atividade de macrófitas aquáticas que ocupam parcelas significativas destes ambientes e são representadas por diversas famílias (Pontederiaceae, Cyperaceae, Nymphaeaceae, Alismataceae, Araceae, etc.) (MENESES; COSTA; COSTA, 2007), diferentemente dos igarapés que devido a correnteza não favorecem a estabilização e a diversificação desta vegetação.

Relacionado ao pH e que também apresentou diferença significativa entre os tipos de ambientes encontra-se a condutividade elétrica que é a capacidade de uma solução em conduzir eletricidade devido a concentração de íons presentes como cálcio, sódio, potássio, sílica, magnésio, entre outros, decorrentes do trabalho de intemperização dos silicatos, não havendo grandes influências húmicas (SANTOS et al., 1985).

Segundo Esteves (1998), a condutividade elétrica fornece importantes informações que possibilitam identificar as várias províncias geológicas, evidenciando, desta maneira, a interação entre o sistema aquático e o terrestre, além de ajudar a detectar fontes poluidoras nos ecossistemas aquáticos.

Relativamente, todos os ambientes apresentaram valores baixos de condutividade elétrica ($4,4 - 68,6 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) podendo ser explicado pelo fato de que a água provém de terrenos relativamente pobres em íons como Ca^+ , Mg_2^+ , K^+ e Na^+ característicos da geologia da área (formação Boa Vista) (MENESES; COSTA; COSTA, 2007) e do tipo de água (clara) (SIOLI, 1990).

A condutividade elétrica apresentou maior variação nos lagos que nos igarapés, mostrando ter alguma relação com o sistema fluvial e o período hidrológico conforme relatado por Garcia e Forsberg (2000). As lagoas marginais e as áreas alagáveis são ambientes de deposição de sedimentos e de retenção de nutrientes das águas que extravasam do leito dos rios na época das chuvas, possuindo assim, uma maior quantidade de material em

decomposição (EPE, 2010), o que pode justificar a variação e os maiores níveis da condutividade elétrica nos lagos.

Em um estudo realizado por Sant'ana (2006) em vários corpos d'água situados no perímetro urbano da cidade de Boa Vista, também foram encontrados valores baixos de condutividade elétrica que variaram de 3,90 a 61,8 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Segundo Bringel e Pascoaloto (2012), valores baixos de condutividade ($< 15 \mu\text{S}/\text{cm}$) também foram encontrados para o alto Rio Negro refletindo a baixa quantidade de íons dissolvidos que representa também uma das características das águas pretas.

De acordo com a CETESB (2014), as formas de nitrogênio (N) encontradas nas águas podem ser divididas em formas reduzidas (nitrogênio orgânico e nitrogênio amoniacal) e oxidadas (nitrito e nitrato). As formas orgânicas dissolvidas são as que mais carecem de estudos, sendo oriundas em rios e lagos da decomposição total e/ou parcial e da excreção dos organismos aquáticos.

O nitrogênio amoniacal é padrão de classificação das águas naturais e padrão de emissão de esgotos. A amônia provoca consumo de oxigênio dissolvido nas águas naturais ao ser oxidada biologicamente (CETESB, 2014).

No ambiente hídrico, o fósforo (P) apresenta-se principalmente na forma de ortofosfatos (diretamente disponíveis para o metabolismo biológico sem necessidade de conversão em formas mais simples), polifosfatos (moléculas mais complexas com dois ou mais átomos de fósforo) e fósforo orgânico (convertido à ortofosfatos em corpos d'água). Como origens naturais podem ser citadas a dissolução de compostos de solo e a decomposição da matéria orgânica e, como origem antropogênica, os despejos domésticos e industriais, detergentes, excrementos de animais e fertilizantes (VON SPERLING, 1996).

O N e o P em altas concentrações podem contribuir para a deterioração da qualidade da água, uma vez que estimula o crescimento de algas e acelera o processo de eutrofização do ecossistema. Também é possível, embora mais difícil de ser notado, que o N possa atuar como fator limitante na produção primária dos ecossistemas aquáticos, caso esteja presente em baixas concentrações (APRILE; DARWICH; MIGUÉIS, 2011).

Alguns nutrientes como o nitrogênio amoniacal (NH_3) e o ortofosfato (PO^{3-}_4) diferiram entre os tipos de ambientes amostrados nesse estudo apresentando valores que variaram, respectivamente, de 0,0 a 2,22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e de 0,05 a 2,22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

De acordo com os dados de Santos et al. (1985) que fizeram um perfil físico-químico das águas da bacia do rio Branco, as concentrações de fósforo total e amônia são baixas, indicando um aporte reduzido a partir do ambiente terrestre. Valores baixos desses nutrientes

também foram encontrados em outros trabalhos em ambientes naturais da Amazônia como no trabalho de Silva (2008) ao estudar o lago Caracaranã e o lago dos Reis no estado de Roraima que encontrou valores 0,00 a 0,20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ demonstrando que ambos são considerados ambientes oligotróficos e o trabalho de Gomes et al. (2011) ao relatar que os compostos nitrogenados encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para alguns dos principais rios do Estado assumindo valor máximo em seu estudo de 0,8 mg.L^{-1} .

Evangelista, Pacobahyba e Sander (2012) ao avaliarem a poluição e o poder de autodepuração do Igarapé Grande (Boa Vista – RR) encontraram valores médios aceitáveis de ambos os nutrientes (0,07 – 0,22 mg/L para PO_4 e 0,28 – 0,34 mg/L para NH_3).

No estudo de Gomes (2000) para o rio Cauamé a autora cita que no período chuvoso há um aumento no aporte de nutrientes como nitrato, nitrito e amônio por processos naturais de mineralização da matéria orgânica (serapilheira), provenientes da lixiviação e de grandes áreas de florestas inundadas (várzea), como também aumento de ferro dissolvido, o que indica ação microbiana aquática, observada pela grande presença de blocos de espumas.

Os ambientes amostrados neste estudo apresentaram baixas profundidades e segundo Pinheiro, Hortêncio e Evangelista (2012) isso os torna vulneráveis a fenômenos antrópicos sendo importante caracterizá-los e monitorá-los contribuindo para a gestão e conservação da biodiversidade nesses corpos aquáticos.

4.2 COMPOSIÇÃO GENÉTICA

4.2.1 Padrões e aspectos dos iniciadores ISSR

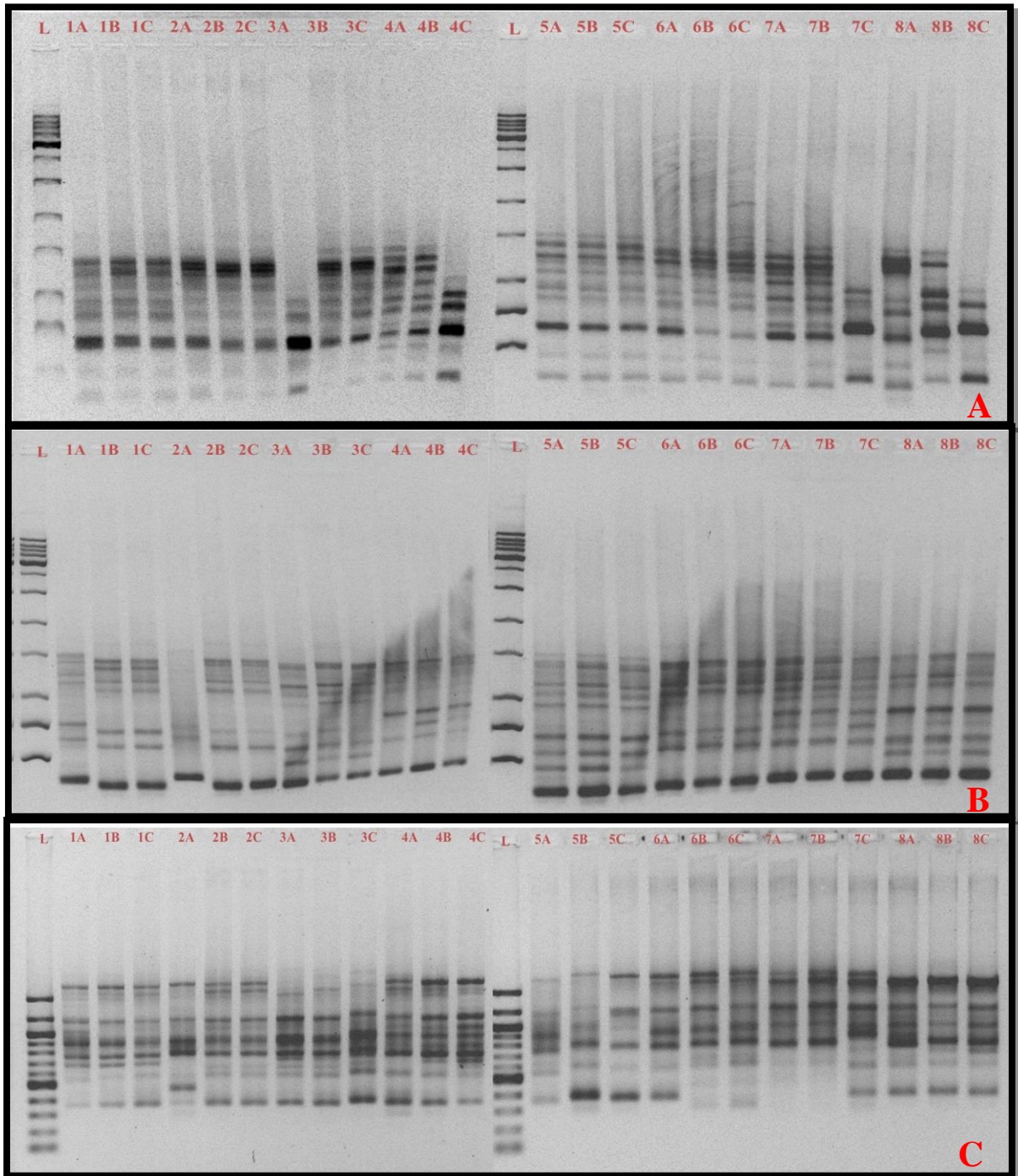
Entre os 21 iniciadores ISSR que produziram ampliações, três apresentaram fragmentos de boa intensidade (Tabela 4). Os iniciadores utilizados geraram um total de 43 locos polimórficos e dois monomórficos.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados com suas respectivas temperaturas de anelamento (T_A °C), número de locos produzidos e porcentagem de polimorfismo

Nome	Sequência	T_A (°C)	Nº de marcas registradas	% de polimorfismo
UBC - 811	(GA) ₈ C	53,4	15	100
UBC - 868	(GAA) ₆	48,8	13	84,6
UBC - 814	(CT) ₈ TG	47,8	17	100
Total			45	94,8

A Figura 4 ilustra o perfil de amplificação dos iniciadores selecionados visualizados em gel de agarose e fotografados sob luz ultravioleta.

Figura 4 - Padrão do gel de agarose (1,2%) com o perfil dos fragmentos produzidos pelos indivíduos de *N. rudgeana*.



Legenda: A - *Primer 811*. L = *Ladder* de 1Kb. B - *Primer 868*. L = *Ladder* de 1Kb. C - *Primer 814*. L = *Ladder* de 100pb.

Diversas pesquisas demonstram que o número de marcadores dominantes varia em decorrência das condições de amplificação adotadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) e de acordo com a espécie em estudo (CIDADE, 2006; JIN; LI, 2007; SOUZA et al., 2008; SILVA et al., 2014).

Lopes et al. (2014) pesquisando a variabilidade genética de 11 populações de *Picconia azorica* (Tutin) Knobl. em Portugal, utilizaram 8 marcadores e obtiveram 64 locos polimórficos. Em pesquisa no Brasil realizada para a caracterização molecular da cana-de-açúcar, Almeida et al. (2009) utilizaram também 8 marcadores em 14 cultivares e obtiveram 56 fragmentos amplificados. Todas as pesquisas citadas concluíram que marcadores ISSR são eficazes na análise da diversidade genética das diferentes espécies em estudo.

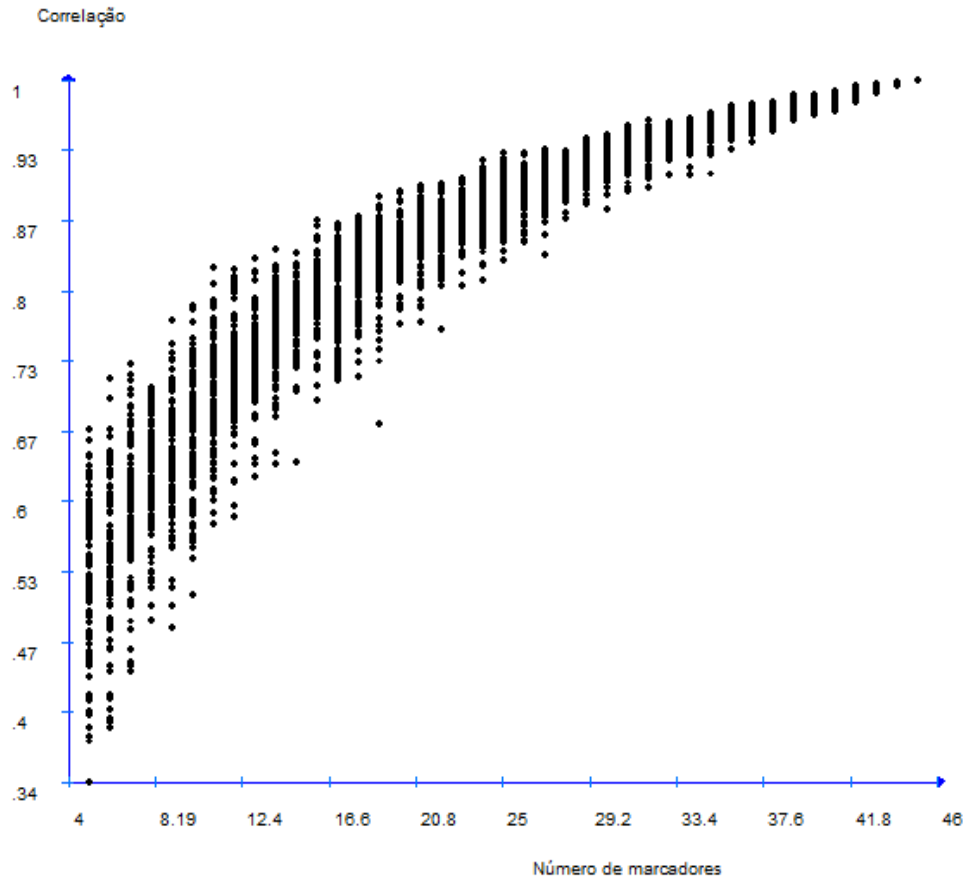
Neste trabalho esta classe de marcadores também se mostrou eficaz para caracterizar indivíduos de *N. rudgeana*, pois a proporção de locos polimórficos foi bastante elevada (94,8%). Em plantas uma das primeiras constatações do uso de sequências repetitivas para análise do DNA foi feita por Nybom et al. (1992), sendo facilmente encontradas repetições de GA (ou CT) e GT (ou CA). Segundo os autores as plantas são altamente polimórficas, assim, cada região genômica que contenha um determinado número de repetições de uma sequência constitui-se num loco genético, podendo apresentar-se altamente variável entre indivíduos e, portanto, altamente informativo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Woods et al. (2005) o iniciador UBC-814 detecta uma alta variação intrapopulacional sendo o marcador que produziu o maior número de fragmentos em seu estudo com *N. odorata* Aiton. Poczai et al. (2011) utilizaram o UBC-868 que também foi um dos iniciadores que produziu o menor número de locos polimórficos ao analisar a variabilidade genética em cinco espécies de *Nymphaea*.

4.2.2 Número ótimo de marcas

A figura 5 apresenta a estimativa do número ótimo de marcadores para caracterizar as populações de *N. rudgeana* pela reamostragem *bootstrap*. O coeficiente de correlação de Pearson (r) aproximou-se da estabilização (0,95) com um tamanho amostral igual a 37 locos, porém, obteve-se um valor de estresse (0,09) fora do limite aceitável que é de 0,05, o que mostra inconsistência nas associações durante as reamostragens. Uma correlação alta (0,98) foi obtida com um número de 43 marcas em que o valor do estresse foi de 0,03. Segundo Kruskal (1964), estes valores representam um número de fragmentos suficientes ou mínimos para obter associações estáveis entre os indivíduos amostrados.

Figura 5 - Coeficiente de correlação do número ótimo de marcadores de DNA para *N. rudgeana*



Alguns estudos realizados com marcadores dominantes apresentaram resultados similares como o de Tardin et al. (2003) que concluíram que 50 marcas eram suficientes para avaliar acessos de alface (*Lactuca sativa* L). Melo-Júnior (2010) ao avaliar a variabilidade genética de *Cavanillesia arborea* K. Schum, considerada uma das árvores símbolo de mata seca, obteve um número ótimo de 57 marcas.

Segundo Colombo, Second e Charrier (2000), um intervalo entre 50 a 100 marcas é considerado suficiente para estimar relações genéticas entre e dentro de espécies vegetais. Neste estudo obteve-se um número de marcas inferior ao citado pelos autores, porém, os valores de correlação e de estresse, juntamente com o alto nível de polimorfismo exibido pelos iniciadores, permitem inferir que as estimativas de diversidade genética entre os acessos estudados apresentam uma boa precisão.

4.2.3 Estrutura genética

Na tabela 5 encontram-se os resultados da AMOVA para as oito populações de *N. rudgeana*.

Tabela 5 - AMOVA das oito populações de *N. rudgeana*. GL = graus de liberdade. SQ = soma dos quadrados dos desvios. GM = quadrado médio

Fonte de variação	GL	SQ	GM	Componentes da variância	Varição total (%)	P
Entre populações	7	99,75	14,25	34,861	47,91	<0,01
Dentro de populações	16	60,66	37,91	37,917	52,09	<0,01
Total	23	160,41	52,16	72,778	100	

Os resultados da AMOVA demonstram que houve uma porcentagem semelhante da variabilidade genética entre e dentro das populações, porém a maior parte da variação se encontra dentro das populações (52,09%), enquanto 47,91% é decorrente de variabilidade interpopulacional.

Martins (1987) relata que os padrões de distribuição da variabilidade genética estão correlacionados com os sistemas reprodutivos das plantas. A espécie em estudo é uma planta perene que apresenta uma polinização preferencial por autogamia e uma dispersão por sementes (PRANCE; ANDERSON, 1976; SANTAMARÍA, 2002). Segundo Nybom e Bartish (2000), plantas com estas características costumam alocar a maior parte da sua variação entre as populações.

Em comparação com trabalhos realizados com espécies de autofecundação como a *Primula boveana* Decne ex. Duby que é uma das espécies vegetais mais ameaçadas no mundo, com menos de 200 indivíduos selvagens sobreviventes nas montanhas do Sinai do Egito, os autores encontraram uma maior variação entre as populações (94%) do que dentro das populações (JIMÉNEZ et al., 2014).

Dong, Gituru e Wang (2010) ao analisarem a variabilidade genética de *Ceratopteris pteroides* (Hook.) Hieron., ao contrário do trabalho anteriormente citado, encontraram uma variação de 69,08% dentro das populações, atribuindo este fato ao tipo de dispersão da espécie (por esporos).

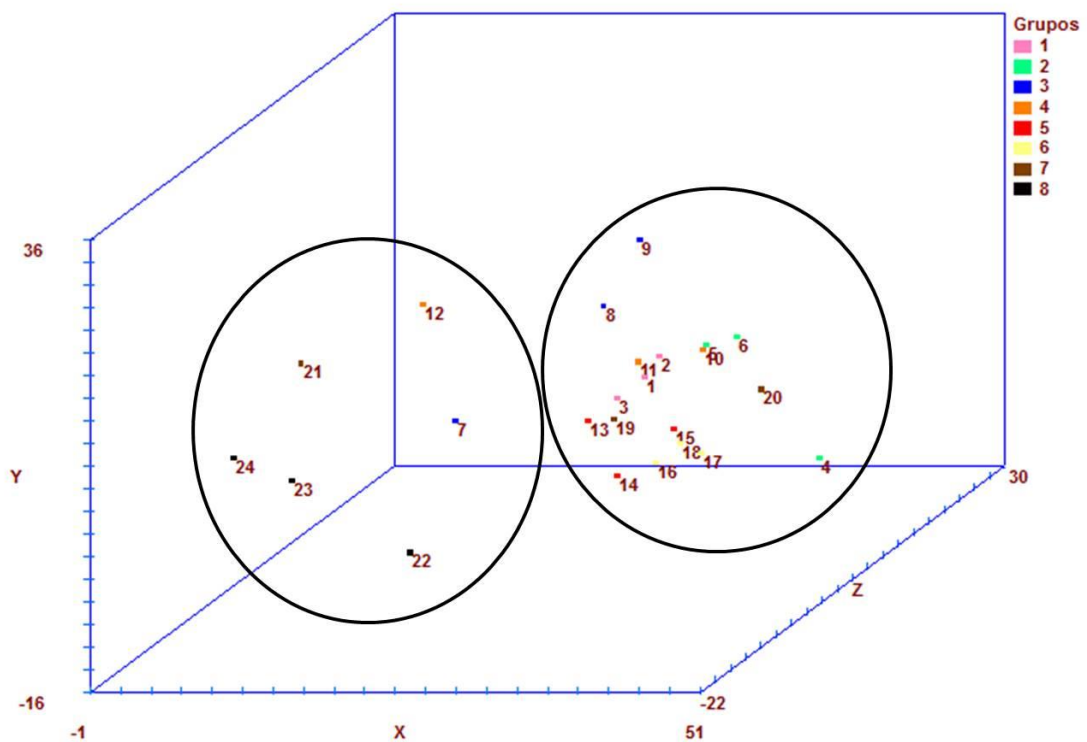
Em relação a *N. rudgeana*, poucos são os trabalhos que relatam sobre o sistema reprodutivo e análises comparativas com os mesmos iniciadores ISSR em outras espécies de

Nymphaea podem refletir alguma luz sobre a influência dos sistemas de reprodução nos níveis de diversidade genética.

Em um estudo realizado com *N. odorata*, os autores encontraram uma maior variação genética dentro das regiões (89,01%) de estudo do que entre as regiões (14%). Segundo os mesmos, o fluxo gênico entre as regiões pode aumentar através da dispersão de propágulos ou sementes a longas distâncias por aves aquáticas ou outros meios de dispersão (WOODS et al., 2005), o que pode ter ocorrido nas populações deste estudo já que as porcentagens de variação intra e interpopulacional estão equilibradas.

A partir da matriz de distância genética de Nei e Li (1979) foi realizada a projeção gráfica (Figura 6) da dissimilaridade entre os 24 acessos analisados e construído o dendograma pelo método UPGMA (Figura 7). As cores classificam os acessos por população. As elipses destacam a formação de dois grupos. No primeiro grupo os acessos estão mais distantes entre si e incluem amostras do ambiente 8 (Lago Norte-Sul) que se aproximaram de acessos dos locais 3 (Igarapé São Lourenço), 4 (Igarapé Tauari) e 7 (Lago do Bonfim). O segundo grupo uniu o maior número de amostras que apresentaram menores distâncias entre si.

Figura 6 - Projeção gráfica das estimativas de distância de dissimilaridade dos 24 acessos de *N. rudgeana* analisados por ISSR



O processo de dispersão das medidas de dissimilaridade no plano tridimensional pode ser considerado satisfatório quando os coeficientes que expressam o grau de distorção e o estresse são inferiores a 20% (CRUZ; CARNEIRO, 2006).

A distorção e o estresse apresentaram respectivamente valores de 18,93% e 24,34%, sendo considerados próximos do adequado, além de alta correlação (0,89) entre as distâncias originais e as distâncias estimadas.

A Figura 7 apresenta o dendograma formado pelos 24 acessos de *N. rudgeana*. Este agrupamento foi obtido pelo método UPGMA, a partir do complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li. O coeficiente de correlação cofenética foi de 81%.

Embora não ocorra uma separação clara dos acessos devido ao tipo de ambiente (igarapé e lago) percebe-se a tendência ao agrupamento dos acessos de algumas populações devido à localização.

Os lagos situados nessas regiões alimentam outros corpos d'água onde as veredas de buritizais encontram-se instaladas (REIS NETO; COSTA, 2010), sendo uma característica que pode favorecer a não diferenciação na composição genética entre lagos e igarapés.

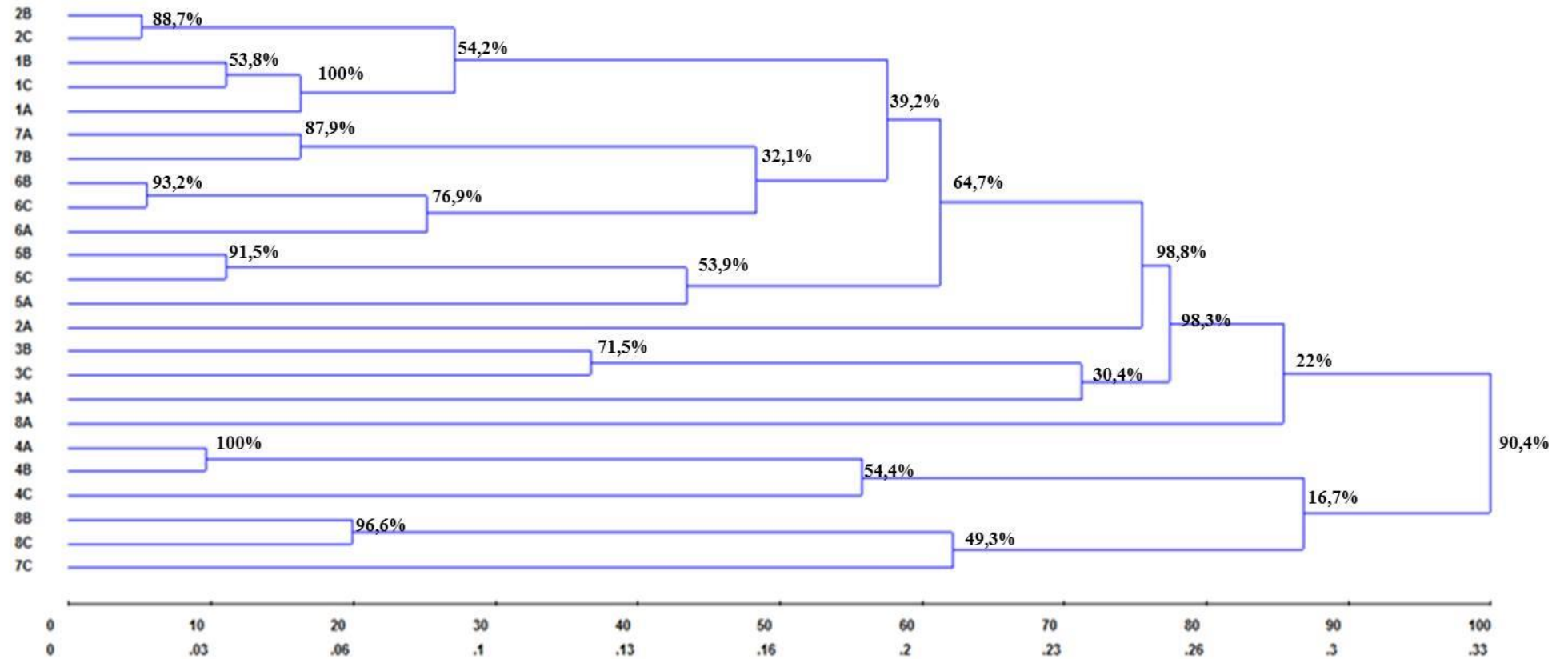
Analisando o dendograma nota-se a formação de dois grandes grupos com 90,4% de consistência. O primeiro nó uniu a maior parte dos acessos dos ambientes 1, 2, 3, 5, 6 e 7 que fazem parte das regiões Norte, Oeste e Leste formando o grupo 1. O segundo nó uniu os acessos dos ambientes 4 e 8 formando o grupo 2.

Ao observar o mapa (Figura 2) podemos notar que o curso do Rio Branco segue no sentido Norte-Sul, recebendo águas provenientes do Rio Cauamé no perímetro urbano da cidade de Boa Vista. Os lagos e igarapés do grupo 1 estão separados por esses dois rios que aparentemente não atuam como uma barreira natural, impedindo o fluxo gênico, visto que a espécie em estudo se dispersa através de sementes pelo fluxo da água, por aves e outros animais aquáticos.

Em espécies autógamas, como é o caso da *N. rudgeana*, o fluxo gênico, através de sementes é mais importante do que através do pólen, podendo ter grande influência na diferenciação das populações (JAIN; BRADSHAW, 1966), sugerindo que essa possível separação em dois clados pode estar relacionada às características hidrográficas e ecológicas de cada local já que nenhum ambiente está diretamente associado aos rios maiores.

Ressalta-se a necessidade de estudos que caracterizem o potencial de dispersão das sementes da *Nymphaea*, sendo uma forma até de explicar as porcentagens de variação inter e intrapopulacional.

Figura 7 – Agrupamento UPGMA dos 24 acessos de *N. rudgeana* gerados a partir da matriz de distância de Nei e Li (1979)



De fato, a grande extensão geográfica das savanas de Roraima abrigam uma elevada heterogeneidade ambiental. Um mosaico formado por campos alagados, veredas de buritizais, florestas de galeria, enclaves de floresta ombrófila, floresta montana, além de quatro tipologias principais de savanas (BARBOSA; MIRANDA, 2005) estão distribuídos em uma amplitude topográfica que varia de 400 a 800 metros de altitude e um gradiente pluviométrico que é maior no sul e menor no norte da região (BARBOSA, 1997).

Segundo Santos e Silva (2007) as aves registradas nas savanas do norte da Amazônia podem ter um alto índice de especialização ocupando apenas algum tipo de vegetação. Os ambientes da região Sul encontram-se mais próximos à área de contato da savana com as florestas o que pode ser um fator de contribuição para a separação em dois grupos.

Todos os ambientes analisados possuem algum tipo de interferência antrópica (alguns mais próximos à área urbana da cidade) sendo os locais do segundo clado os que apresentam de forma geral, menor nível de impacto (ver informações na Figura 4).

Essas hipóteses foram geradas a *posteriori* sendo necessárias mais amostragens em pontos intermediários que comprovem a influência de fatores ambientais e do nível de impacto, podendo atuar como um fator seletivo na diferenciação das populações.

O teste de Mantel apontou que não houve uma correlação significativa das distâncias geográficas com as distâncias genéticas estimadas ($r = 0,53$; $P = 0,085$) e nem com as distâncias ambientais estimadas ($r = -0,23$; $P = 0,682$) entre os parâmetros limnológicos. Este resultado pode ser devido aos locais serem relativamente próximos e compartilharem características geográficas e ecológicas semelhantes.

Segundo Nybom e Bartish (2000) em espécies de autopolinização é mais difícil encontrar uma correlação do aumento das taxas de variação entre as populações com a distância geográfica.

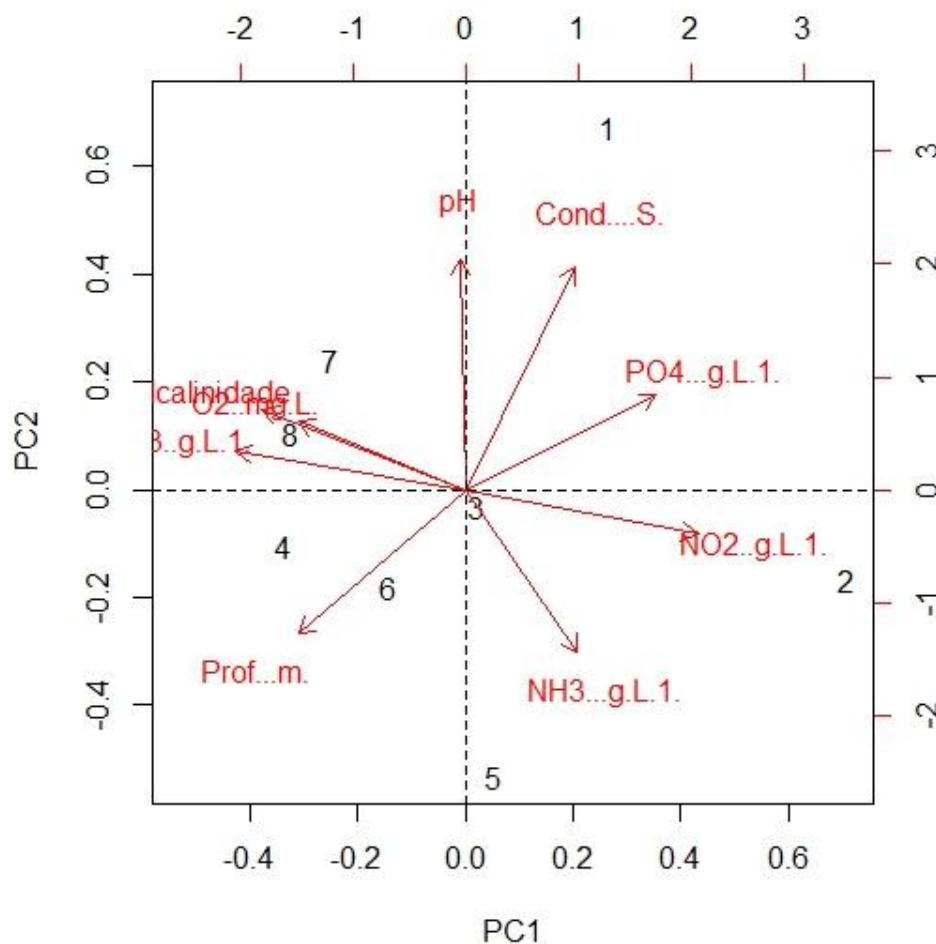
4.3 RELAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA COM AS VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS

A avaliação conjunta dos resultados limnológicos e da composição genética foi realizada através de uma análise de ordenação e de uma regressão linear.

O eixo 1 da composição limnológica (Figura 8) e da composição genética representou, respectivamente, 45% e 55% da variabilidade amostrada. Os *loadings* dos parâmetros limnológicos estão apresentados na tabela 6.

A correlação entre a diversidade genética e os fatores abióticos foi alta e significativa ($r^2 = 76\%$; $p = <0,01$).

Figura 8 – Representação gráfica da Análise de Componentes Principais (PCA) da composição limnológica



A análise gráfica (Figura 9) juntamente com os valores dos *loadings* permitiu inferir que a composição genética diverge ao longo de um gradiente ambiental relacionado com a diminuição da alcalinidade e do nitrato e um aumento nas concentrações de nitrito e fosfato. Assim, podemos observar que os ambientes da região sul (Lago Norte Sul e Igarapé Tauari) novamente se agruparam reforçando o que foi encontrado no dendograma.

Em vista disso, as macrófitas aquáticas podem atuar como principais controladoras da dinâmica de nutrientes no ecossistema. A vegetação enraizada, por exemplo, é uma verdadeira bomba de nutrientes deslocando fósforo e outros elementos de camadas mais profundas do sedimento para a coluna d'água através da absorção pelas raízes e subsequentes excreção, degradação e decomposição (POMEROY, 1970; CARPENTER, 1980; GRANÉLI; SOLANDER, 1988).

Figura 9 - Relação entre a composição genética baseada em marcadores ISSR (expressa pelo valor do primeiro eixo da PCoA) da *N. rudgeana* com a composição limnológica (expressa pelo valor do primeiro eixo da PCA). Ig = Igarapé; Lg = Lago

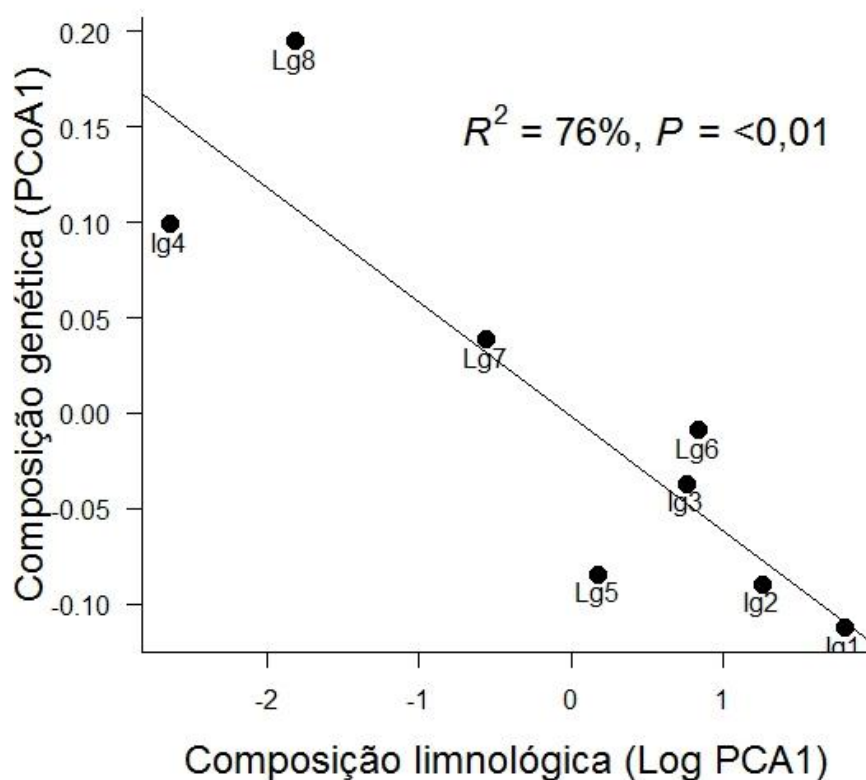


Tabela 6 - Correlação dos parâmetros limnológicos com o eixo 1 da (PCA)

Variável	Loadings
pH	-0.01018233
Alcalinidade	-0.39547515
O ₂	-0.32455657
Condutividade	0.21214614
NO ₃	-0.44581965
NH ₃	0.21771951
NO ₂	0.45182035
PO ₄	0.37097939
Profundidade	-0.32438943

Porém, alguns nutrientes como o nitrogênio e o fósforo, podem ser fatores limitante ao crescimento das plantas em muitos ambientes aquáticos (BIUDES; CAMARGO, 2008).

O nitrogênio, está entre os elementos mais abundantes da biosfera, constituindo cerca de 78% da atmosfera terrestre e a capacidade do átomo de assumir uma diversidade de estados quimicamente estáveis (NH_4^+ , NH_3 , N_2 , N_2O , NO , NO_2^- e NO_3^-) tem grande significado biogeoquímico. A maioria dos organismos incorpora N em seu metabolismo, que é então utilizado na síntese de monômeros precursores de proteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos (MARIN et al., 1999; STRAUSS; MITCHELL; LAMBERTI, 2002; FELIX; CARDOSO, 2004).

O fósforo, em contraste com sua relativa escassez na biosfera, é também muito comum no metabolismo celular e nas estruturas biológicas. Além de seu importante papel na manutenção da permeabilidade seletiva de membranas fosfolipídicas, o fósforo, na forma de ésteres de fosfato e anidridos, está presente em polímeros genéticos (DNA e RNA), metabólitos intermediários, coenzimas e no principal veículo de energia bioquímica, o ATP (WILLIAMS, 1997; STERNER; ELSER, 2002; NELSON; COX, 2004).

Interpretando as análises de uma forma conjunta, podemos inferir que a composição genética pode ser influenciada devido a diferenças nas concentrações de N e P no meio hídrico, sendo que de alguma forma, características genéticas mais adaptadas a um determinado gradiente acabam se sobressaindo e, assim, aumentando o seu número de indivíduos.

Lembramos também que isso pode ser influenciado por outros fatores do meio como a alcalinidade e o pH que são necessários para determinar a presença de algumas bactérias para completar o ciclo biogeoquímico dos elementos, como no caso do nitrogênio.

O Igarapé 4 e o lago 8 (região sul) possuíram valores, de uma forma geral, mais baixos de nitrato, nitrito e fosfato e valores intermediários de alcalinidade (APÊNDICE B) em comparação com os outros ambientes.

Outros estudos realizados com plantas aquáticas também demonstraram a interferência de variáveis ambientais na diferenciação genética de espécies vegetais. Triest e Mannaert (2006) ao investigar a relação ambiente-genótipo de populações de *Callitriche* sp. obteve uma associação significativa entre alguns fatores, dentre eles o nitrogênio total do sedimento e a alcalinidade.

Alguns dos elementos estudados, ou outros que não foram inclusos nesse estudo, podem estar atuando como fator limitante ao crescimento da *N. rudgeana* selecionando genótipos que se adaptem a estas características e favoreça o seu crescimento, sendo

necessários estudos com um maior número de amostras, em condições naturais e controladas para confirmar a existência dessa relação.

5 CONCLUSÕES

A maior parte da variabilidade genética da *N. rudgeana* se encontra dentro das populações (52,09%), enquanto 47,91% é decorrente de variação interpopulacional, podendo estes percentuais serem justificados devido a espécie em estudo apresentar uma polinização preferencial por autogamia e uma dispersão por sementes sendo necessários estudos mais detalhados sobre o sistema de reprodução da espécie e a sua influência nos níveis de diversidade genética.

A análise do dendograma mostra que foram formados dois grandes grupos com 90,4% de consistência. Esta separação, que se apresentou em todas as análises, pode ter ocorrido devido a um gradiente ambiental relacionado com a diminuição da alcalinidade e do nitrato e um aumento nas concentrações de nitrito e fosfato, fazendo com que a composição genética divergisse, separando os ambientes da região sul (4 - Igarapé Tauari e o 8 - Lago Norte Sul) dos demais, sendo necessários estudos mais detalhados, com um maior número de amostras e de outras variáveis, para confirmar a existência dessa relação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. M. A. et al. Caracterização molecular de cultivares de Cana-de-Açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1771-1776, 2009. Edição especial.
- APHA. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21.ed. USA: APHA/AWWA/WEF, 2005. 1496p.
- APRILE, F. M.; DARWICH, A. J.; MIGUÉIS, A. M. Modelo de fluxo de nitrogênio e fósforo para sistemas flúvio-lacustres às margens do rio Negro, Amazonas, Brasil. In: SANTOS-SILVA, E. N.; SCUDELLER, V. V.; CAVALCANTI, M. J. (Org.). **Meio físico, diversidade biológica e sociocultural do baixo rio Negro, Amazônia Central**. Volume 3. Manaus: Rizoma Editorial, 2011. p. 15-42.
- AYRES, M., M. et al. **Bioestat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Ong Mamirauá, 2007. 380p.
- BARBOSA, R. I. Distribuição das chuvas em Roraima. In: BARBOSA, R. I.; FERREIRA, E. J. G.; CASTELLÓN, E. G. (Eds.). **Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima**. Manaus: INPA, 1997. p. 325-335.
- BARBOSA, R. I.; MIRANDA, I. S. Fitofisionomias e diversidade vegetal das savanas de Roraima. In: BARBOSA, R. I.; XAUD, H. A. M.; COSTA E SOUZA, J. M. (Eds.). **Savanas de Roraima: etnoecologia, biodiversidade e potencialidades agrossilvopastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005. p. 61-78.
- BARREIRA, S. et al. Consequências 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**, Piracicaba, v. 71, p.119-130, ago. 2006.
- BIUDES, J. F. V.; CAMARGO, A. F. M. Estudos dos fatores limitantes à produção primária por macrófitas aquáticas no Brasil. **Oecologia Brasiliensis**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 7-19, 2008.
- BOVE, C. P.; PAZ, J. **Guia de campo das Plantas Aquáticas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2009. 176p.
- BRINGEL, S. R. B.; PASCOALOTO, D. As águas transfronteiriças do alto rio Negro. In: SOUZA, L. A. G.; CASTELLÓN, E. G. (Eds.). **Desvendando as fronteiras do conhecimento na região amazônica do alto rio Negro**. Manaus: INPA, 2012. p. 7-22
- CAMARGO, A. F. M.; FLORENTINO, E. R. Population Dynamics and net primary production of the aquatic macrophyte *Nymphaea rudgeana* C.F. Mey in Lotic environment of the Itanhaém River Basin (SP, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 60, n.1, p. 83-92, 2000.
- CARPENTER, S. R. Enrichment of Lake Wingra, Wisconsin, by submersed macrophyte decay. **Ecology**, [S.l.], v. 61, n.5, p.1145–1155, 1980
- CAVALLARI, M.M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. 2004. 106p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CESAR, D. et al. Atalhos entre a limnologia, a microbiologia e a biologia molecular: diversidade de microrganismos planctônicos. In: ROLAND, F.; CESAR, D.; MARINHO, M. (Eds.). **Lições de limnologia**. São Carlos: RIMA, 2005. p. 273-278.

CETESB. **Índice de qualidade da água**. Disponível em: www.cetesb.gov.br/agua. Acesso em: 13 jul. 2014.

CHAVEERAC, A; TANEE, T.; SUDMOON, R. Molecular identification and barcodes for the genus *Nymphaea*. **Acta Biologica Hungarica**, Budapeste, v.62, n.3, p.328-340, set. 2011.

CIDADE, F. W. **Análise da variabilidade genética de *Paspalum notatum* Flugge (Poaceae – Panicoideae) com o uso de marcadores moleculares, morfológicos e citometria de fluxo**. 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: análise multivariada e simulação**. Viçosa: UFV, 2006. 175p.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: UFV, 2011. 620p.

CRUZ, C.D., CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 585p.

DONG, Y. H.; GITURU, R. W.; WANG, Q. F. Genetic variation and gene flow in the endangered aquatic fern *Ceratopteris pteridoides*, and conservation implications. **Annales Botanici Fennici**, [S.l.], v.47, n.1, p. 34–44, 2010.

EPE. **Bacia hidrográfica do Rio Branco/RR - estudos de inventário hidrelétrico**. Tomo I. Boa Vista: Hydros Engenharia, 2010. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/MEIOAMBIENTE/Documents/AAI%20Branco/9%20-%20Inventario%20Hidreletrico%20Branco%20-%20Diagnostico%20Socioambiental%20-%20Parte%201.pdf>> Acesso em: 13 jul. 2014.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 575p.

EVANGELISTA, R. A. O. ; PACOBAHYBA, L. D. ; SANDER, C. Poluição e autodepuração do igarapé Grande, Boa Vista - RR. In: SCARLATO, F. C.; EVANGELISTA, R. A. O.; ARAÚJO, W. F. (Org.). **Amazônia: terra e água - degradação e desenvolvimento sustentável**. Boa Vista: Editora UFRR, 2012. p. 40-59.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Baltimore, v. 131, n. 2, p. 479-491, jun. 1992.

- FABRÉ, N. N. et al. Limnologia. In: CPRM. **Zoneamento ecológico-econômico da região central do estado de Roraima Tomo II**. Boa Vista: Ministério de Minas e Energia. 2002. p. 124 - 129.
- FELIX, E. P.; CARDOSO, A. A. Amônia (NH₃) atmosférica: fontes, transformação, sorvedouros e métodos de análise. **Química Nova**, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 123–130, 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1998. 220p.
- GARCIA, F. C.; FORSBERG, B. R. Caracterização físico-química de lagoas da planície de alagamento do alto rio Paraguai, Sepotuba e Cabaçal, em Cáceres, Mato Grosso. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 3, 2000, Corumbá. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2000. p. 1-26.
- GOMES, N. A. **Estrutura da comunidade de algas perifíticas no igarapé Água Boa e no rio Cauamé, município de Boa Vista, estado de Roraima, Brasil, ao longo de um ciclo sazonal**. 2000. 306f. Tese (Doutorado em Biologia de água doce e pesca interior) – Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia, Manaus, 2000.
- GOMES, N. A. et al. Hidroquímica do rio Branco e outros afluentes do rio Negro/Roraima, Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 19, 2011. **Anais...** Maceió: Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 2011. p. 1-14.
- GRANÉLI, W.; SOLANDER, D. Influence of aquatic macrophytes on phosphorus cycling in lakes. **Hydrobiologia**, [S.l.], v. 170, n. 1, p.245–266, 1988.
- HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. **Genetics and conservation**. United States: Benjamin Cummings Publishing Company, 1983. p. 335-348.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D. et al. [Eds.] **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sinauer: Sunderland, 1989. p. 43–63.
- HAN, Y. C. et al. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in central China detected by ISSR markers. **Aquatic Botany**, [S.l.], v. 86, n. 1, p. 69-75, jan. 2007.
- HOSSAERT-MCKEY, M. et al. The evolving genetic history of a population of *Lathyrus sylvestris*: Evidence from temporal and spatial genetic structure. **Evolution**, [S.l.], v. 50, n.5, p. 1808-1821, out. 1996.
- JAIN, S. K.; BRADSHAW, A. D. Evolutionary divergence among adjacent plant populations. 1. the evidence and its theoretical analysis. **Heredity**, London, v. 21, p. 407- 441, 1966.
- JIMÉNEZ, A. et al. Low genetic diversity and high levels of inbreeding in the Sinai primrose (*Primula boveana*), a species on the brink of extinction. **Plant Systematics and Evolution**, [S.l.], v. 300, n.5, p. 1199-1208, maio 2014.
- JIN, Z.; LI, J. Genetic differentiation in endangered *Heptacodium miconioides* Rehd. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 245, n. 1-3, p. 130–136, jun. 2007.

- KRUSKAL, J. B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika*, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1–27, mar. 1964.
- LOPES, M. S. et al. Genetic diversity of an Azorean endemic and endangered plant species inferred from ISSR markers. *AoB PLANTS*, United Kingdom, v. 6, p. 1-15, jun. 2014.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L.; FOSTER, R. B. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity*, v.81, n. 2, p. 134–143, ago. 1998.
- MARIN, V.A. et al. **Fixação Biológica de Nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.** Brasília: Embrapa, 1999. 24p.
- MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, v. 35, n. 2, p. 71-78, abr. 1987.
- MELO-JÚNIOR, A. F. **Diversidade, estrutura genética e fenologia de populações naturais de *Cavanillesia arborea* K. Schum no norte do estado de Minas Gerais.** 2010. 101p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- MENESES, M. E. N. S.; COSTA, M. L. C.; COSTA, J. A. V. Os lagos do lavrado de Boa Vista - Roraima: fisiografia, físico-química das águas, mineralogia e química dos sedimentos. *Revista Brasileira de Geociências*, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 478-489, set. 2007.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry.** 4.ed. New York: Macmillan Higher Education, 2004. 1100p.
- NYBOM, H. et al. Oligonucleotide DNA fingerprinting detects a multiallelic locus in box elder (*Acer negundo*). *Molecular Ecology*, [S.l.], v.1, n.1, p. 65- 67, maio 1992.
- NYBOM, H.; BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Prespectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**, [S.l.], v. 3, p. 93-114. 2000.
- PAIVA, R. M. S. et al. Nota técnica sobre modificações na metodologia de extração para obtenção do material genético de macrófitas aquáticas das grades do PPBio do estado de Roraima. *Boletim do Museu Integrado de Roraima*, v.8, n.2, p. 68-74, jun. 2014.
- PESSONI, L. A. **Estratégias de análise da diversidade em germoplasma de cajueiro (*Anacardium spp. L.*).** 2007. 174p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- PINHEIRO, M. N. M. ; HORTENCIO, M. M. ; EVANGELISTA, R. A. O. Distribuição Espacial da Biodiversidade de Macrófitas Aquática Nos Lagos da Região Nordeste do Estado de Roraima. *Revista GeoNorte*, [S.l.], v. 1, p. 162-174, 2012.
- POCZAI, P. et al. Genetic Variability of Thermal Nymphaea (Nymphaeaceae) Populations Based on ISSR Markers: Implications on Relationships, Hybridization, and Conservation. *Plant Molecular Biology Reporter*, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 906–918, dez. 2011.

- POMEROY, R. L. Strategy of mineral cycling. **Annual Review of Ecology and Systematics**, [S.l.], v.1, n. 4006, p.171–190, 1970.
- PRANCE, G. T.; ANDERSON, A. B. Studies of the floral biology of neotropical Nymphaeaceae. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 6, n. 2, p. 163 – 170, abr./jun. 1976.
- REIS NETO, R. A.; COSTA, J. A. V. Mapeamento de unidades geomorfológicas da bacia do Rio Cauamé – RR. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, [S.l.], v.11, n.2, p.3-10, 2010.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 9, p. 40 – 43, jul./ago. 1999.
- RORAIMA. Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento de Roraima. **Informações Socioeconômicas do Município de Boa Vista – RR**. Boa Vista: CGEES, 2010a. 68p.
- _____. Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento de Roraima. **Informações Socioeconômicas do Município do Cantá – RR**. Boa Vista: CGEES, 2010b. 62p.
- _____. Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento de Roraima. **Informações Socioeconômicas do Município do Bonfim – RR**. Boa Vista: CGEES, 2010c. 61p.
- ROTTA, E.; BELTRAMI, L. C. C.; ZONTA, M. **Manual de prática de coleta e herborização de material botânico**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 31p.
- SANT’ANA, A. C. **Análise multivariada da qualidade da água superficial no município de Boa Vista – RR**. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais)–Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006.
- SANTAMARÍA, L. Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. **Acta Oecologica**, [S.l.], v. 23, n.3, p. 137-154, jun. 2002.
- SANTOS, M. P. D.; SILVA, J. M. C. As aves das savanas de Roraima. **Revista Brasileira de Ornitologia**, [S.l.], v.15, n. 2, p. 189-207, jun. 2007.
- SANTOS, S. L. B. **Variabilidade genética em populações de *Agave sisalana* Perrine (Agavaceae) detectada pela técnica *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR)**. 2011. 85f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2011.
- SANTOS, U. M. et al. Rios da Bacia Amazônica II: Os afluentes do rio Branco. **Acta Amazonica**, Manaus, v.15, n.1-2, p. 147-156, 1985.
- SCHAFFER, A. **Fundamentos de ecologia e biogeografia das águas continentais**. Porto Alegre: ed. UFRGS, 1985. 532p.
- SILVA, C. A. et al. Reproductive success and genetic diversity of *Psychotria hastisepala* (Rubiaceae), in fragmented Atlantic forest, Southeastern Brazil. **Revista Biologia Tropical**, Costa Rica, v. 62, n.1, p. 309-319, mar. 2014.
- SILVA, I. G. **Estrutura e funcionamento da comunidade fitoplanctônica em ambientes lacustres do estado de Roraima, Brasil**. 2008. 93f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

- SIOLI, H. **Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais**. 2. ed. Petrópolis: Vozes, 1990. 72p.
- SOUSA, N. R. Processos genético-evolutivos e os recursos fitogenéticos. In: SOUSA, N. R.; SOUZA, A. das G. C. de. (Eds.). **Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental: conservação, pesquisa e utilização**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p. 19-26
- SOUZA, G. A. et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.7, p. 843-849, jul. 2008.
- STERNER, R. W.; ELSER, J. J. **Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere**. Princeton: Princeton University Press, 2002. 439p.
- STRAUSS, E. A.; MITCHELL, N. L.; LAMBERTI, G. A. Factors regulating nitrification in aquatic sediments: effects of organic carbon, nitrogen availability, and pH. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Canada, v. 59, n. 3, p.554–563, 2002.
- TARDIN, F.D. et al. Genetic diversity and determination of the optimum number of RAPD markers in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n. 1, p. 1-5, 2003.
- TELLES, M. P. C. et al. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, nov. 2001.
- TRIEST, L. et al. Genetic differentiation of submerged plant populations and taxa between habitats. **Hydrobiologia**, [S.l.], v.656, n.1, p.15-27, nov. 2010.
- TRIEST, L.; MANNAERT, A. The relationship between *Callitriche* L. clones and environmental variables using genotyping. **Hydrobiologia**, [S.l.], v. 570, p. 73–77, 2006.
- VASCONCELOS, M. C. **Classificação de rios e sua relação com a comunidade de macroinvertebrados em riachos**. 2012. 182p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- VON SPERLING, E. **Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2.ed. Belo Horizonte: UFMG, 1996. 243p.
- WETZEL, R. G. **Limnologia**. Barcelona: Omega, 1981. 679 p.
- WIERSEMA, J.H. A monograph of *Nymphaea* subgenus *Hydrocallis* (Nymphaeaceae). **Systematic Botany Monographs**, [S.l.], v. 16, p. 1-112, 1987.
- WILLIAMS, R. J. P. The natural selection of the chemical elements. **Cellular and molecular life sciences**, [S.l.], v.53, n.10, p.816–829, 1997.
- WOODS, K. et al. Pattern of Variation and Systematics of *Nymphaea odorata*: I. Evidence from Morphology and Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). **Systematic Botany**, Nova York, v. 30, n. 3, p. 471–480, jul. 2005.

APÊNDICE

Apêndice A – Ficha de campo elaborada para caracterização dos ambientes amostrados.

FICHA DE CAMPO

Local: _____

Data: _____ **Horário:** _____ **Coordenadas:** _____

Coleta de que material: _____

Choveu nas 24h que antecederam a visita? () Sim () Não

Tempo: () Nublado () Ensolarado () Chovendo

1. Existe atividade humana na área circundante à linha de água ? (faixa de \pm 50 m a contar da margem)

() Agricultura () Estradas () Indústrias () Pesca/Barragem

() Pecuária () Construções () Florestação () Outras

2. Tipo de vegetação na margem:

() Mata Ciliar () Árvores () Outras

() Gramíneas () Arbustos

3. Tipo de substrato no leito e nas margens:

() Areia () Pedras * Presença de erosão: () Sim () Não

() Argila () Artificial

4. Presença de animais: () Sim () Não Quais?

5. Estado da água:

6. Cheiro da água:

() Sem fluxo

() Fluxo laminar

() Sem cheiro

() Cheiro de peixe podre

() Fluxo turbulento

() Cheiro agradável

() Cheiro de esgoto

6. Nutrientes:

Água transparente com plantas aquáticas

Água verde com microalgas

Água muito verde com microalgas

Água verde a castanha

Outras

7. Turvação:

Água límpida Água de cor escura Água acastanhada

Observações relevantes:

Desenho esquemático do ambiente:

Continuação...

Ambientes	Meses	pH	Alcalinidade	O ₂ (mg/L)	Cond. (µS)	NO ₃ (µg.L ⁻¹)	NH ₃ (µg.L ⁻¹)	NO ₂ (µg.L ⁻¹)	PO ₄ (µg.L ⁻¹)	Prof. (m)
Lago Maringá	Out.	5,5	0	5,2	7,45	0,221	0,233	0	0,069	1,2
	Nov.	5,5	8	5,5	7,21	0,220	0,025	0	0,056	0,9
	Dez.	5,5	4	*	6,42	0,217	0,097	0	0,222	1,0
	Jan.	6	8	*	5,90	0,000	0,190	0,015	0,918	1,1
	Fev.	5,5	4	4,5	6,08	0,005	0,082	0,021	0,871	1,0
	Mar.	5,5	12	5	6,90	0,215	0	0	0,384	0,6
	Abr.	5,5	8	5,2	8,72	0,225	0,137	0,001	0,434	0,3
Lago Cauamé	Jul.	5,5	0	7	7,45	0,226	0,497	0,000	0,116	1,5
	Ago.	6	0	4,5	7,08	0,150	0,246	0,008	0,177	1,5
	Set.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Out.	5,5	0	6,6	6,39	0,228	0,231	0	0,531	1,8
	Nov.	5,5	8	5	5,90	0,212	0,258	0,001	0,358	1,4
	Dez.	6	8	7	6,20	0,220	0,028	0	0,840	1,8
	Jan.	6	18	5	8,96	0,016	0,097	0,010	0,380	1,8
	Fev.	7	8	4,5	10,42	0,121	0,007	0,009	1,067	1,3
	Mar.	7	12	6,2	16,60	0,206	0,162	0,002	0,627	0,9
Abr.	6,5	12	1,8	28,60	0,212	0,277	0,003	0,742	0,4	
Lago Bonfim	Jul.	6	4	2,05	11,93	0,103	0,368	0,009	0,265	1
	Ago.	6	20	6	10,24	0,152	0,231	0,007	0,175	1
	Set.	5,5	0	5,1	9	0,222	0,261	0	1,156	0,9
	Out.	5	0	6	8,57	0,221	0,121	0	0,855	1
	Nov.	6	20	6,5	8,8	0,222	0	0	0,305	0,9
	Dez.	6	8	7	9,79	0,187	0,077	0,003	1,140	0,75

Conclusão...

Ambientes	Meses	pH	Alcalinidade	O ₂ (mg/L)	Cond. (µS)	NO ₃ (µg.L ⁻¹)	NH ₃ (µg.L ⁻¹)	NO ₂ (µg.L ⁻¹)	PO ₄ (µg.L ⁻¹)	Prof. (m)
Lago Bonfim	Jan.	6	28	1,6	15,01	0,146	0,405	0,008	0,972	0,5
	Fev.	6	8	1,5	21	0,073	0,073	0,014	1,321	0,45
	Mar.	6,5	16	2	*	0,203	1,361	0,003	1,235	0,1
	Abr.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Lago Norte-Sul	Jul.	5,5	4	4,92	9,45	0,088	0,286	0,011	0,463	1,05
	Ago.	6	0	5,4	8,92	0,172	0,146	0,005	0,083	1,05
	Set.	5,5	0	6,5	8,02	0,220	0,267	0	0,451	1,4
	Out.	5,5	0	5,5	7,51	0,214	0,063	0	0,296	1,5
	Nov.	6	20	6	8,85	0,222	0	0	0,214	1,4
	Dez.	6	12	7	8,48	0,216	0,023	0	0,778	1,2
	Jan.	6	20	7	13,19	0,016	0,129	0,011	0,760	0,85
	Fev.	6	12	5,5	18,33	0,084	0,058	0,014	1,078	0,8
	Mar.	6,5	20	7	42,7	0,172	0,285	0,006	0,488	0,3
	Abr.	6	12	6	68,6	0,220	0,138	0,002	0,664	0,3