



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
2014

RAÍSSA MARIA SAMPAIO DE PAIVA

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

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Recursos Naturais, do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais – PRONAT, da Universidade Federal de Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais, com área de concentração em 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
2014

*Aos meus queridos avós Marcelio,
Marinete, Aida 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 te 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 Schietti 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 notamos que houve essa mesma separação ocorrendo 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

Limnologic and genetical aspects of *Nymphaea rudgeana* G. Mey. in water environments in Roraima savannas areas. 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 -	Flor de <i>Nymphaea</i> aberta evidenciando a presença do polinizador, um besouro do gênero <i>Cyclocephala</i>	19
Figura 2 -	Folhas flutuantes de <i>N. rudgeana</i> com destaque para a sua flor aberta	20
Figura 3 -	Área de estudo selecionada nos municípios de Boa Vista, Bonfim e Cantá ..	27
Figura 4 -	Caracterização geral dos ambientes de estudo	29
Figura 5 -	Padrão do gel de agarose com o perfil dos fragmentos produzidos pelos indivíduos de <i>N. rudgeana</i> . A: <i>Primer</i> 811. L = <i>Ladder</i> de 1Kb. B: <i>Primer</i> 868. L = <i>Ladder</i> de 1Kb. C: <i>Primer</i> 814. L = <i>Ladder</i> de 100pb	41
Figura 6 -	Coefficiente de correlação do número ótimo de marcadores de DNA para <i>N. rudgeana</i>	43
Figura 7 -	Projeção gráfica das estimativas de distância de dissimilaridade dos 24 acessos de <i>N. rudgeana</i> analisados por ISSR	45
Figura 8 -	Agrupamento UPGMA dos 24 acessos de <i>N. rudgeana</i> gerados a partir da matriz de distância de Nei e Li (1979)	47
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	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de folhas coletadas nos igarapés e lagos selecionados e suas respectivas identificações (ID)	32
Tabela 2 - Amostras selecionadas para a amplificação com seus respectivos graus de pureza e a sua concentração	34
Tabela 3 - Valores médios das variáveis limnológicas analisadas em cada ambiente de estudo	37
Tabela 4 - Iniciadores utilizados com suas respectivas temperaturas de anelamento ($T_A^{\circ}\text{C}$), número de locos produzidos e porcentagem de polimorfismo	40
Tabela 5 - Análise de variância molecular das oito populações de <i>N. rudgeana</i> . GL = graus de liberdade. SQ = soma dos quadrados dos desvios. GM = quadrado médio	44
Tabela 6 - Correlação dos parâmetros limnológicos com o eixo 1 da análise de componentes principais (PCA)	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	AMBIENTES AQUÁTICOS NA SAVANA DE RORAIMA	12
1.2	MACRÓFITAS AQUÁTICAS	14
1.3	<i>Nymphaea rudgeana</i> G. Mey	17
1.4	VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS	20
1.4.1	Marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	ÁREA DE ESTUDO	26
3.2	PERÍODO DE AMOSTRAGEM	31
3.3	VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS	31
3.4	METODOLOGIA DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	32
3.5	METODOLOGIA DE COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL GENÉTICO	32
3.5.1	Extração de DNA	33
3.5.2	Quantificação do DNA por espectrofotometria	33
3.5.3	Análise molecular	33
3.5.4	Eletroforese	34
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS AMOSTRAS	35
3.6.1	Identificação do número ótimo de marcas	35
3.6.2	Análise de variância molecular	35
3.6.3	Projeção gráfica das distâncias e análise de agrupamento	35
3.6.4	Distâncias geográficas	36
3.6.5	Análise de ordenação	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS	37

4.2 COMPOSIÇÃO GENÉTICA	40
4.2.1 Padrões e aspectos dos iniciadores ISSR	40
4.2.2 Número ótimo de marcas	42
4.2.3 Estrutura genética	43
4.3 RELAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA COM AS VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS	48
5 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE	65

1 INTRODUÇÃO

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.

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. que do ponto de vista ecológico é considerada bioindicadora de ambientes pouco impactados ou não poluídos e habitualmente têm sido utilizada por populações ribeirinhas como planta medicinal. Porém, aspectos importantes da biologia e ecologia desta espécie ainda são extremamente desconhecidos.

Diante disso, o presente estudo tem por finalidade entender como os fatores limnológicos podem estar relacionados à distribuição da variabilidade genética da *N. rudgeana* nos diferentes ambientes aquáticos (lagos e igarapés) em áreas de savana do estado de Roraima.

1.1 AMBIENTES AQUÁTICOS NA SAVANA DE RORAIMA

Situado no extremo norte do Brasil, o estado de Roraima pode ser dividido em três grandes fitofisionomias: o domínio das florestas, as campinas/campinaranas e as savanas (BARBOSA et al., 2007). Este último tipo vegetacional, também denominado de “lavrado”, é definido como um ecossistema caracterizado pela presença de uma camada continua de vegetação herbácea e um dossel descontínuo de arbustos e árvores, ocupando uma área de aproximadamente 43.000km² situada na porção central do Estado, onde está inserida a capital Boa Vista (VALE JÚNIOR; SCHAEFER, 2010; BARBOSA; CAMPOS, 2011).

Basicamente, o lavrado apresenta a maior parte dos ambientes aquáticos do complexo amazônico, representado por extensos rios, paranás, igarapés, planícies de inundação (várzeas e igapós) e represas (GOMES, 2000), que se distinguem uns dos outros por possuírem tamanhos variados e características peculiares, fazendo com que a região tenha um grande potencial para o desenvolvimento e aprofundamento dos estudos limnológicos (MIRANDA; ABSY, 1997; SILVA, 2008).

Em seu trabalho, Sioli (1990) relata que a diversidade ambiental na Amazônia é ampliada pelos diferentes tipos de água que são divididas em três grandes grupos: brancas, pretas e claras.

As águas brancas são típicas dos rios Solimões, Amazonas, Madeira, Purus entre outros, possuem elevada carga de sedimentos, o que provoca a cor branca da água, e são ricos em sais dissolvidos provenientes da Cordilheira dos Andes e da erosão dos sedimentos encontrados ao longo das bacias de drenagem (JUNK, 1983; SIOLI, 1990).

As águas pretas, cujo principal representante é o rio Negro, apresentam esta cor devido às substâncias fúlvicas e húmicas dissolvidas, possui baixos níveis de nutrientes e de sedimentos, o pH é ácido e é extremamente pobre em sais minerais (JUNK, 1983).

As águas claras (rios Tapajós e Xingu) são oriundas da Amazônia Central, que em virtude do relevo mais regular, oferece menor taxa de erosão. São transparentes e possuem cor esverdeada, apresentam características químicas de transição entre os dois tipos anteriores e o pH varia entre 4,5 e 7,0 (JUNK, 1983; SIOLI, 1990).

No Estado, a maioria dos igarapés são de águas claras, porém no período chuvoso, recebem muito material em suspensão e são consideradas brancas (GOMES, 2000).

Geralmente, associado às nascentes dos igarapés encontramos uma predominância de buritis (*Mauritia flexuosa* L. f.) rodeados por espécies arbustivas à arbóreas, formando veredas que povoam amplamente a região e que são típicas do lavrado, possuindo uma vegetação mais complexa ao se aproximar das matas de galeria dos rios maiores. Recobrando o solo ocorrem ciperáceas e gramíneas em proporções que podem variar de acordo com a granulometria e a umidade presente. Alguns igarapés, também intermitentes, são mais largos que as veredas de buritizais, bem como mais encorpados e diversos nas suas vegetações ciliares. Os rios maiores quando atravessam o lavrado formam matas de galerias tão interessantes quanto complexas nas porções marginais que ocupam, desde o dique até as áreas de várzea (CARVALHO, 2009).

O lavrado ainda apresenta um sistema de lagoas perenes ou estacionais relacionado a redes de drenagens jovens e pouco desenvolvidas, possuindo morfologias variadas. A maioria possui pequenas extensões e poucas profundidades; apresentam caráter intermitente diante do longo período de estiagem, próprio da região (outubro – março). Caracterizam-se ainda por exibirem densa ocupação por macrófitas aquáticas. Essas regiões se destacam para a conservação tanto pela importância hidrológica quanto pela fauna e flora associada. As lagoas estão diretamente relacionadas à recarga dos aquíferos e podem ou não estar interligadas entre si, ou com igarapés e buritizais que auxiliam na manutenção do fluxo gênico entre as espécies, além de formar um sistema ecológico e paisagístico muito interessante, contribuindo para a identidade regional roraimense (GOMES, 2000; MENESES, 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS; PINTO; BARBOSA, 2008; CARVALHO, 2009).

Constata-se, porém, que os lagos, riachos e rios mundiais têm provido importantes serviços e recursos, sendo utilizados para o consumo humano, agricultura, abastecimento de indústrias, produção de energia, transporte, recreação e descarga de detritos de todas as espécies (VIANNA; VIANNA JUNIOR; VIANNA, 2005), sendo um recurso essencial ao uso humano que, apesar de renovável, necessita cada vez mais de um manejo criterioso para não se tornar escasso pela própria degradação antropogênica (VITOUSEK et al., 1997).

Entretanto, o número de espécies nos ecossistemas aquáticos continentais brasileiros ainda é impreciso e difícil de ser estimado. Entre as dificuldades destacam-se o número de bacias hidrográficas jamais inventariadas; a insuficiência de pesquisadores e a falta de infra-estrutura necessária para amostragens; o reduzido número de inventários efetuados e a dispersão das informações que frequentemente são de difícil acesso (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005).

Em Roraima, grande parte dos ambientes aquáticos estão sofrendo intensas pressões antrópicas e segundo Silva (2008) uma atitude necessária e urgente é conhecer e avaliar a biodiversidade desses ambientes, haja vista que poucos estudos foram realizados nesses corpos de água.

Entre os trabalhos realizados, foi possível observar uma alta riqueza na vegetação aquática, tendo sido registradas por Carranza (2006) 90 espécies de plantas ao estudar quatro desses corpos de água. Neves (2007) ao realizar um inventário do Lago do Trevo constatou a presença de 31 espécies de macrófitas que ocupavam 90% de sua extensão.

Em linhas gerais, a Amazônia é uma das regiões mais ricas do planeta e ainda extremamente desconhecida, possui uma diversidade de sistemas hídricos que são muito importantes para a sobrevivência de diversos organismos e que determinam através de uma interação de fatores químicos, físicos e biológicos a área de distribuição de espécies de algas, bactérias, fungos, invertebrados e macrófitas aquáticas (ROCHA, 2003; VAL et al., 2010; WETZEL, 2011), sendo este último, componente fundamental em corpos d'água, pois desempenham inúmeras funções, principalmente de cunho ecológico (ESTEVES, 2011).

1.2 MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Macrófita aquática, para o International Biology Programme (IBP), é a denominação mais adequada para caracterizar plantas que habitam desde brejos até ambientes verdadeiramente aquáticos. Desta forma, incluem-se vegetais que variam desde macroalgas, como o gênero *Chara* L., até angiospermas, como o gênero *Typha* L., capazes de colonizar diversos habitats,

de salobros ou salgados, passando por rios, lagos, brejos e corredeiras até fontes termais (SCREMIN-DIAS, 1999; ESTEVES, 2011).

Quando comparada a outras comunidades aquáticas, por exemplo, o fitoplâncton, as macrófitas tiveram seus estudos retardados principalmente pelas dificuldades metodológicas na amostragem dessa comunidade e pela pouca importância que os pesquisadores atribuíam a estes vegetais no metabolismo do ecossistema (POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003).

Conseqüentemente, os primeiros estudos acerca das macrófitas aquáticas foram realizados em ecossistemas de regiões temperadas, e somente após algumas décadas passaram a ser desenvolvidos nos trópicos (THOMAZ; BINI, 2003).

O marco inicial dos estudos sobre ecologia de macrófitas aquáticas no Brasil foi o trabalho do dinamarquês Warming, publicado em 1892, em seu idioma, a obra “*Lagoa Santa. Et bidrag til den biologiske plantegeografi*”. Contudo, esse trabalho trata principalmente da sistemática, distribuição e ecologia de plantas terrestres, embora contenha a descrição de várias espécies de plantas aquáticas. Ainda que não verse exclusivamente sobre este grupo, essa publicação serviu de base para muitos estudos desenvolvidos em ecossistemas aquáticos continentais (MOURA-JÚNIOR, 2012).

Na Amazônia, trabalhos sobre esta comunidade já haviam se iniciado na mesma época em uma expedição comandada pelo botânico Carl Frederic von Martius e o zoólogo alemão Johann Baptist von Spix (1817 a 1820), que, subindo o rio Amazonas de Belém a Santarém, descreveram inúmeros espécimes aquáticos, entre plantas e animais. Após quatro décadas, Allen publicou um livro sobre aspectos ecológicos da mais famosa planta aquática a “*Victoria regia*”, hoje, *Victoria amazonica* (Poepp.) JC Sowerby (ESTEVES, 1998).

Quase um século depois, Black em 1950 descreveu aspectos anatômicos e ecológicos de gramíneas aquáticas da região amazônica e Braun, por volta de 1952, estudou vários fatores ambientais em corpos de água dessa região, incluindo também diferentes comunidades biológicas como as macrófitas aquáticas (POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003; ESTEVES, 2011).

Na década de 70, através de um convênio realizado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e o Departamento de Ecologia Tropical do Instituto Max-Planck de Limnologia da Alemanha, foram intensificados os trabalhos nos corpos de água da região norte. Um dos pesquisadores importantes para o avanço do conhecimento sobre macrófitas aquáticas foi o limnólogo Wolfgang Junk que desenvolveu diversos trabalhos sobre ecologia, produção floral, biomassa e produtividade do gênero *Paspalum* L. (ESTEVES, 2011),

demonstrando o papel da vegetação aquática na ciclagem de nutrientes nos ambientes em que vivem (HOWARD-WILLIAMS; JUNK, 1977 apud ESTEVES; CAMARGO, 1986).

Entre as espécies da região estudada, a *V. amazonica* apresenta uma série de trabalhos que se iniciou com detalhes de nomenclatura. Entre as pesquisas, Prance e Ário (1975) relatam que este táxon teve vários estudos de biologia floral realizados na Europa com plantas cultivadas em estufas. A biologia floral de *N. rudgeana* e *N. ampla* (Salisb.) DC. também foram estudadas mais tarde por Prance e Anderson (1976).

Em outro contexto, o uso das macrófitas como fonte potencial de matéria orgânica na adubação, foi motivo do estudo de Noda; Junk; Pahlen (1978), que testou o matupá em uma cultura de feijão-de-asa, na tentativa de mostrar o seu papel como fertilizante. Já Albuquerque (1981) apresentou seu trabalho com treze espécies de macrófitas flutuantes livres, mostrando a possibilidade do seu uso na alimentação do gado da Amazônia.

No que se refere à biologia e ecologia das macrófitas aquáticas alguns trabalhos tem sido feitos nas últimas décadas, como o de Junk e Furch (1980) que dão algumas informações sobre a química da água e o levantamento de macrófitas aquáticas de rios e igarapés da Bacia Amazônica e áreas adjacentes.

Em outras pesquisas, a associação dessas plantas com animais passa a ser estudado, como o trabalho de Vieira (1992), que enfoca um Orthoptera da espécie *Paulinia acuminata*, que desenvolve seu ciclo de vida em *Salvinia* sp. Ség. e *Pistia stratiotes* L. Pouco depois a dinâmica dos nutrientes, provenientes da decomposição de *Paspalum fasciculatum* Willd. ex Flügge e *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc., que são plantas terrestres e aquáticas foi investigada por Furch e Junk (1992). Após um ano, a biomassa de diferentes plantas herbáceas (*Paspalum repens* P.J. Bergius, *Oryza perennis* Strains, *Luziola spruceana* Benth. ex Döll, *Hymenachne amplexicaulis* (Rudge) Nees) foram enfoque do trabalho realizado por Junk e Piedade (1993).

Sendo assim, diante de todos os esforços, o número de trabalhos sobre macrófitas aquáticas foi aumentando e mais recentemente pesquisas abordando sobre identificação (ALMEIDA; AMARAL; SILVA, 2004; FERREIRA; ALMEIDA; SILVA, 2011), estratégias reprodutivas (FERREIRA et al., 2010), associação com peixes e macroinvertebrados (SÁNCHEZ-BOTERO et al., 2003), papel como bioindicadora (FERREIRA et al., 2011; ROCHA et al., 2012), quantificação de biomassa e produtividade primária (PEIXOTO; COSTA, 2004; BARBOSA; PIEDADE; KIRCHNER, 2008; GONÇALVES et al., 2010), caracterização molecular (LAMOTE et al., 2005), análise filogenética (DKHAR et al., 2010), entre outros, foram publicados.

Hoje, sabe-se que as macrófitas desempenham importantes papéis nos ambientes aquáticos, dentre eles: a estabilização de sedimentos, a produção primária e de detritos, a absorção, a acumulação e liberação de nutrientes; a interferência com o fitoplâncton e com outras espécies de macrófitas através do sombreamento e competição por nutrientes; a diversificação de habitat, servem de substrato para perífíton, e como refúgio e nidificação para animais aquáticos e terrestres, como fonte de alimentos para peixes, aves e mamíferos (BEYRUTH, 1992), sendo inclusive agentes de regeneração da água (BOVE et al., 2003).

As macrófitas respondem de forma rápida a gradientes ambientais, sendo adequadas para mapear a variabilidade encontrada em ambientes distintos. No entanto, devido às suas características fisiológicas e sensibilidade a variações no ambiente, podem ter o seu estabelecimento e crescimento determinados por concentração de nutrientes e pH das águas (TREVELIN et al., 2007).

No Brasil, a maior parte das pesquisas têm sido realizadas em ambientes perturbados por ações antrópicas, devido ao crescimento excessivo de macrófitas aquáticas que pode ocorrer pelas condições favoráveis ao seu desenvolvimento tais como a eutrofização artificial e as modificações hidrológicas do ecossistema. Essas alterações podem provocar a proliferação de uma espécie, criando condições ótimas para o seu aumento ou proporcionando condições desfavoráveis para outras espécies, que deixam de exercer uma pressão competitiva sobre ela (PISTORI, 2009). Diferentemente, na região Amazônica o estudo da vegetação aquática se torna um desafio ainda maior devido ao grande número de rios, lagos e planícies inundáveis (PIEIDADE et al., 2010).

No Estado de Roraima, as pesquisas sobre macrófitas aquáticas se resumem a monografias e dissertações que realizaram levantamentos florísticos devido à falta destas informações. Recentemente, Cunha-Santino; Pacobahyba; Bianchini Jr. (2010) publicaram um estudo de decomposição de macrófitas aquáticas no Igarapé do Cantá, sendo uma das poucas divulgações sobre estes vegetais no Estado com este enfoque.

Em vista disso, uma das espécies facilmente encontrada em grande parte dos levantamentos realizados é a *N. rudgeana* que possui poucos estudos acerca de seus aspectos biológicos, ecológicos e moleculares.

1.3 *Nymphaea rudgeana* G. Mey

A família Nymphaeaceae é constituída por herbáceas aquáticas de distribuição cosmopolita, incluindo seis gêneros e cerca de 60 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). Esta posicionada entre as Angiospermas Basais devido a pouca diferenciação entre anteras e

filetes, ao pólen monossulcado com columela ausente, aos carpelos selados por secreção e aos gametófitos 4-nucleados, além de características moleculares (APG III, 2009; SIMPSON, 2010).

Entre os gêneros que pertencem à família estão: *Nymphaea* L., *Nuphar* J. E. Smith, *Barclaya* W., *Euryale* R. A. Salisbury, *Ondinea* Hartog e *Victoria* J. Lindley. (LES et al., 1999; THORNE, 2000; APG III, 2009). De acordo com Yoo et al. (2005) *Victoria* e *Nymphaea* são os únicos citados para a América do Sul. No Brasil, *Victoria* ocorre na Amazônia e no Pantanal e *Nymphaea* apresenta populações distribuídas por todo o território nacional (SOUZA; LORENZI, 2008; SOUSA; MATIAS, 2012).

Segundo Pott (1998), cerca de 50 espécies representam o gênero *Nymphaea* que é constituído por plantas aquáticas de folhas flutuantes e que chama atenção pela beleza de suas flores. A palavra *Nymphaea* que significa “ninfã” induz a histórias passadas em que na idade média, as suas flores alvas eram utilizadas na Europa para fazer uma poção do amor. As pessoas que coletavam as flores deviam tomar cuidado para não serem atraídas pelas ninfas da água (AMARAL; BITTRICH, 2002), por isso o nome atribuído à planta.

O sistema de classificação adotado para as *Nymphaea* até hoje é o de Conard (1905) que reconhece dois grandes grupos: o Apocarpiae (carpelos parcialmente fundidos) e Syncarpiae (carpelos completamente fundidos) e cinco subgêneros: *Anecphyra* Caspary, *Brachyceras* Caspary, *Hydrocallis* Planchon, *Lotus* DC e *Nymphaea* DC.

Ecologicamente, as *Nymphaea* são típicas de lagoas ou de águas paradas. A folha juvenil é submersa e a folha flutuante é empinada pelo vento dando aspecto avermelhado aos ambientes aquáticos em que estão presentes. A flor abre duas noites seguidas e o odor de acetona atrai os polinizadores que geralmente são besouros do gênero *Cyclocephala* (Figura 1) ou pequenas abelhas que ficam presos na flor durante o dia e são liberados, no mínimo, após 24 horas (POTT; POTT, 2000).

Segundo Heslop-Harrison (1955) as *Nymphaea* apresentam polinização cruzada que ocorre geralmente através da ação de insetos, porém, muitas das espécies são capazes de autopolinização, e ocasionalmente, assim têm sido relatado para *N. rudgeana*, *N. amazonum* Mart. & Zucc. e *N. stellata* Willd.

Outra importância que as espécies do gênero *Nymphaea* apresentam é o seu papel econômico, pois servem de alimento para populações da Ásia e da África, o óleo da sua flor pode ser utilizado na fabricação de perfumes, possui propriedades medicinais sendo importante na cicatrização de feridas e úlceras, sua flor serve de alimento para gado, entre outras inúmeras funções (POTT; POTT, 2000; AMARAL; BITTRICH, 2002).

Figura 1 – Flor de *Nymphaea* aberta evidenciando a presença do polinizador, um besouro do gênero *Cyclocephala*.



Foto: R. C. Caleffi

Dentre as espécies deste gênero, a *N. rudgeana*, que pertence ao subg. *Hydrocallis*, possui suas folhas elípticas a 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).

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 autopolinização, 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).

Figura 2 – Folhas flutuantes de *N. rudgeana* com destaque para a sua flor aberta.



Foto: R. C. Caleffi

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; 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 foram extremamente sensíveis e diferenciaram populações naturais de cultivares.

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).

1.4 VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS

Com o advento das tecnologias modernas da genética e da biologia molecular, houve um aumento significativo de metodologias e de suas aplicações para resolver problemas e

aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais, sendo as populações naturais muito estudadas nesta área (e, também mais recentemente, no da genética da conservação) (FALEIRO, 2007).

Nos dias atuais, a genética aplicada à biologia da conservação permite o diagnóstico do status de preservação de várias espécies, bem como passa a sugerir estratégias alternativas de manejo com fins de proteção da variabilidade genética (SANTOS; GUIMARÃES; REDONDO, 2002), aumentando assim a adaptação das populações às alterações ambientais e contribuindo para a manutenção das populações a longo prazo (ROSSETTO; WEAVER; DIXON, 1995).

Entre os conceitos utilizados em estudos moleculares, um dos mais importantes é o da biodiversidade molecular, ou variabilidade genética, que é definida como toda a diversidade que ocorre dentro das espécies, ou seja, tanto as diferenças entre indivíduos quanto entre populações de uma determinada espécie de ser vivo, e que atualmente está sendo utilizada como instrumento para sistematas e, especialmente para ecólogos, quando esses buscam confirmações mais concisas para as hipóteses ecológicas (AVISE et al., 1987).

Ecologicamente, a variabilidade genética pode ser afetada pela densidade populacional, natureza das relações entre os indivíduos e o ambiente e ainda, pelas interações entre os indivíduos e as populações locais. Geneticamente, é caracterizada pelos padrões de fluxo gênico, pelo sistema reprodutivo, pelas mutações gênicas e pelas estratégias adaptativas aos ambientes locais (MARTINS, 1987).

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).

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 a conservação. Uma maneira de acessar e caracterizar essa variabilidade é através do uso de marcadores moleculares permitindo observar diretamente na sequência gênica os níveis de polimorfismos existentes, entre outros dados (BRANDÃO, 2008).

1.4.1 Marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética

Em meio às ferramentas que surgiram, a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) foi um dos passos mais revolucionários nos estudos genéticos fazendo com que o DNA passasse a ser o ponto focal das pesquisas, possibilitando a produção de múltiplas cópias de sequências dessa molécula (BORÉM, 1998).

A criação dessa tecnologia permitiu a análise molecular da variabilidade do DNA, podendo determinar pontos de referência nos cromossomos, que passaram a ser chamados de “marcadores moleculares”, que nada mais são, do que sequências genômicas provenientes de um segmento específico do DNA que corresponde a uma região expressa ou não (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os estudos de genética de populações avançaram significativamente na década de 60, a partir do desenvolvimento dessa técnica (GOMES; MOURA, 2010).

O princípio da utilização desses marcadores é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas. Entre as vantagens dos marcadores moleculares, pode-se mencionar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a

identificação direta do genótipo sem a influência do ambiente, a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos. Há, ainda, a possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes (FALEIRO, 2007).

O principal interesse do uso da PCR e dos marcadores moleculares em estudos de sistemática molecular reside na sua conjugação com outras técnicas, tais como a eletroforese dos fragmentos amplificados e o sequenciamento do DNA, que permite o estudo da mesma região do genoma de várias espécies aparentadas e a sua comparação, originando uma classificação mais natural ao nível da espécie (JUDD et al., 2007).

Dentre os marcados moleculares, podemos citar o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), entre outros.

O ISSR é um marcador semiarbitrário, composto por fragmentos de regiões repetidas de 100 a 3000 pb amplificados via PCR usando um único iniciador (16-20 pb) sendo construído a partir de sequências de microssatélites (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994).

As vantagens do uso desse marcador é que ele detecta uma alta variabilidade, não é necessário haver conhecimento prévio dos dados de sequência do DNA para construção dos iniciadores, pode ser visualizado em gel de poliacrilamida ou agarose, necessita de pequenas quantidades de DNA por reação e é uma técnica de baixo custo. A principal desvantagem é a sua dominância (GONZÁLES; AGUIRRE, 2007), impossibilitando a diferenciação de locos homozigóticos e/ou heterozigóticos (LOPES et al., 2002).

O ISSR pode ser utilizado em inúmeros estudos de polimorfismos, de variabilidade genética, na identificação de indivíduos, no mapeamento genético, na construção de árvores filogenéticas, na identificação de paternidade e maternidade, em pesquisas de evolução, entre outros (GONZÁLES; AGUIRRE, 2007).

Entre os trabalhos utilizando este marcador podemos citar o de Souza et al. (2008) que teve como objetivo estimar a diversidade genética de amostras provenientes de oito estados brasileiros de *Zabrotes subfasciatus* (caruncho-do-feijão), que é uma praga agrícola que têm se destacado quanto às perdas durante o armazenamento de grãos de feijão.

Nas pesquisas sobre plantas, muitos autores (PESSONI, 2007; COSTA, 2010; RODRIGUES, 2010; SANTOS, 2011) utilizam os marcadores ISSR com diversos objetivos, como o trabalho de Cidade (2006) que analisou a variabilidade genética de *Paspalum notatum* Flüggé, concluindo que este marcador mostrou-se eficiente para distinção dos genótipos e que

a espécie estudada apresentou ampla variabilidade, obtendo assim, bons resultados. No mesmo ano, Fracaro (2006) teve como uma das suas metas determinar a ecologia molecular e a variabilidade genética de uma Lamiaceae, comparando RAPD com ISSR. Mais tarde, Almeida et al. (2009) realizou a caracterização molecular de cultivares de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), concluindo que os marcadores ISSR são promissores no acesso da diversidade genética e na identificação de *fingerprinting* do DNA.

Entre outros estudos realizados com esses marcadores, podemos destacar alguns com plantas aquáticas como 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 determinam 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.

2 OBJETIVOS

Os objetivos dessa pesquisa foram:

2.1 OBJETIVO GERAL

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

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Avaliar as características limnológicas (PH, oxigênio dissolvido, nitrato, nitrito, amônia, alcalinidade, ortofosfato, condutividade elétrica e profundidade) dos ambientes aquáticos amostrados;
- (2) Analisar a variabilidade genética inter e intrapopulacional da *N. rudgeana* através de marcadores ISSR;
- (3) Estimar as distâncias genéticas entre as populações e avaliar sua relação com a origem geográfica;
- (4) 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

O Estado de Roraima possui uma área total de 225.116,1 km² e situa-se no extremo norte do território brasileiro. Limita-se, geograficamente, ao norte com a República Bolivariana da Venezuela e a República da Guiana, ao sul com o estado do Amazonas, a leste com a República da Guiana e o estado do Pará e a oeste com a República Bolivariana da Venezuela e o estado do Amazonas. É cortado em quase toda extensão, no sentido norte-sul, pelo rio Branco, um afluente do rio Negro que faz parte dos grandes rios do Sistema Amazônico (IBGE, 1996; GOMES, 2000).

Os ambientes de amostragem foram selecionados em um raio de 50 km ao redor da cidade de Boa Vista, 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 3).

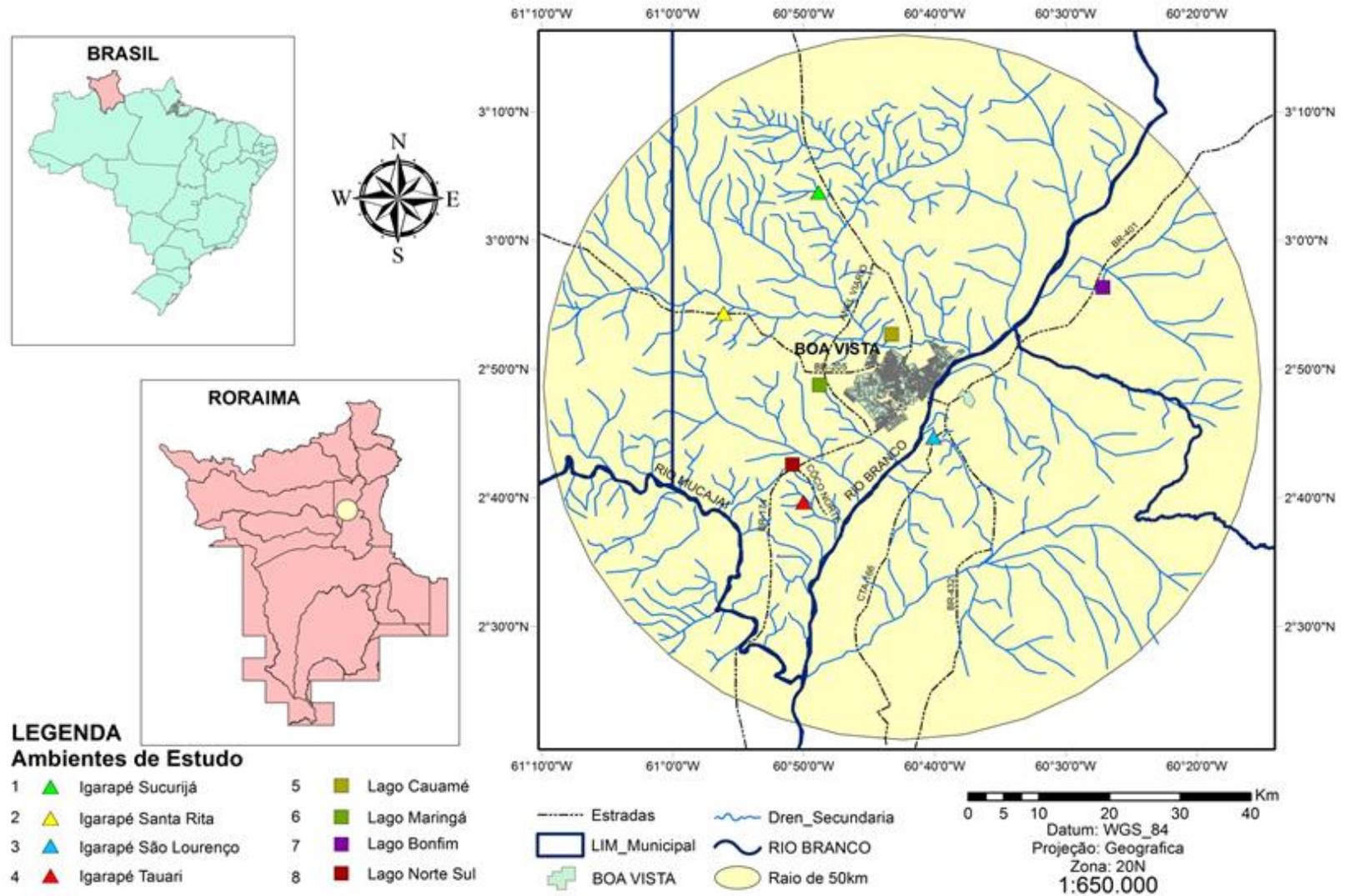
Os ambientes definidos pertencem a propriedades particulares e áreas de estudo do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio), e as coletas somente foram realizadas após a concessão das autorizações dos proprietários e responsáveis pelas áreas.

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.

Os locais analisados fazem parte da bacia hidrográfica do rio Branco, com cerca de 192.000 km² de área, sendo em pauta bastante densa e tem como seus principais contribuintes, na sua margem direita, os rios Cauamé, Mucajaí, Ajarani, Água Boa do Univini, Catrimâni e Xeriuni, e, na margem esquerda, os rios Quitauaú, Cachorro, Anauá e Itapará. O rio Branco é considerado, de forma geral, como um rio de água branca, embora seus tributários possam ser classificados como rios de águas brancas, pretas ou claras, em função da sua localização (EPE, 2010).

A bacia hidrográfica do Rio Branco é dividida em trechos sendo a área de estudo localizada em duas microbacias: a do Cauamé e a do Rio Branco III (CPRM, 2002).

Figura 3 – Área de estudo selecionada nos municípios de Boa Vista, Bonfim e Cantá.



A microbacia do rio Cauamé apresenta distintos domínios geomorfológicos, com predomínio de grandes extensões de relevo plano, coberto por savanas e composto por igarapés com alinhamento de veredas de buritis e inúmeras lagoas fechadas, ou parcialmente drenadas por estes igarapés, áreas abatidas (abaciadas), áreas com relevo ondulado (lateritas) e serras remanescentes (SCHAEFER; VALE JÚNIOR, 1997; NETO; COSTA, 2010).

A geologia da área está representada pelos sedimentos cenozóicos da Formação Boa Vista constituída por argilas arenosas com níveis de cascalhos intercalados e mal selecionados e pequenas manchas da Formação Apoteri compostas por basaltos, andesitos e diques de diabásio (db), próximos ao conjunto de serras denominadas Nova Olinda (CPRM, 1998).

O município de Boa Vista, capital do Estado de Roraima, possui uma área territorial que corresponde a 2,54% do território do Estado, limitando-se ao norte com o município de Amajari; ao sul com o município de Mucajaí e Cantá; a leste com Normandia e Bonfim e a oeste com Alto Alegre. O clima é tropical úmido, apresentando estação chuvosa no verão. 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 açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) e pelo buriti (*M. flexuosa*) (SEPLAN, 2010a).

Atravessando o Rio Branco, em sua margem direita encontra-se o município do Cantá que apresenta uma área de 7.664,79 km² 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 (SEPLAN, 2010b).

O município do Bonfim, distante 130 km do Cantá, possui uma área territorial de 8.095,319 km², o clima é do tipo quente e semi-úmido e apresenta regiões de floresta estacional à ombrófila, possuindo algumas áreas de tensão ecológica compreendidas por savana (ecótono) (SEPLAN, 2010c).

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 4.

Figura 4 – Caracterização geral dos ambientes de estudo.

Ambiente 1: Igarapé Sucurijá
 Localização: Município de Boa Vista
 Características: Localizado próximo ao Campus Agrotécnico da UFRR. Rodeado por gramíneas, árvores e arbustos. Água turva com presença de plantas aquáticas.



Ambiente 2: Igarapé Santa Rita
 Localização: 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
 Localização: 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 Tauari

Localização: 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

Localização: 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

Localização: Município de Boa Vista

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

Ambiente 7: Lago do Bonfim

Localização: 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

Localização: Município de Boa Vista

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

3.2 PERÍODO DE AMOSTRAGEM

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

3.3 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 (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* (EATON et al., 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).

3.4 METODOLOGIA 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 – UFMG, sendo confirmada a identificação pelo especialista Marco Otávio Dias Pivari (UFMG).

3.5 METODOLOGIA 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 - UFRR), aonde foram conservadas em freezer à -70°C até o momento da realização das extrações.

3.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA iniciou-se seguindo o protocolo CTAB (ROMANO; BRASILEIRO, 1999) modificado por Paiva (2012). Em seu trabalho, a autora substituiu o nitrogênio líquido por um almofariz previamente congelado a -70°C e adiciona a proteinase K a uma concentração final de 50µg/ml ao protocolo tradicional, obtendo assim, boa qualidade e quantidade na extração de DNA de plantas aquáticas, incluindo representantes do gênero *Nymphaea*.

3.5.2 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 µl 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.

3.5.3 Análise molecular

Os espécimes de *N. rudgeana* foram analisados por marcadores ISSR pelo método de PCR. Os iniciadores testados e as condições de amplificação foram baseadas no estudo de Woods et al. (2005), Chaveerach; Tanee; 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*.

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

O volume da reação foi de 25 μl , constituído por: 20ng de DNA genômico, 5 μM de cada iniciador, 10 μM de dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2,0mM MgCl_2 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).

3.5.4 Eletroforese

O volume total dos produtos amplificados foram misturados a 1,0 μ l 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).

3.6 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 será utilizada para realização das análises através do Programa GENES (CRUZ, 2001).

3.6.1 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).

3.6.2 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; QUATTRO (1992).

3.6.3 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 UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). 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.

3.6.4 Distâncias geográficas

Para verificar se existe alguma 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.

3.6.5 Análise de ordenação

Relacionamos as variáveis limnológicas com a composição genética a fim de responder nossas perguntas. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico R.

Primeiramente, foi realizada uma análise de coordenadas principais (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 análise de componentes principais (PCA) (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 logaritimizados [$\log(X+2)$] para apresentar uma distribuição linear.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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; 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, Fabr e et al. (2002) encontraram valores de 6,2 a 7,4 para o Alto Rio Branco, que vai desde a forma o do próprio rio até o norte da cidade de Caracaraí.

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 estabiliza o e a diversifica o desta vegeta o.

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

Segundo Esteves (1998), a condutividade elétrica fornece importantes informa es que possibilitam identificar as várias províncias geológicas, evidenciando, desta maneira, a intera o 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 prov m de terrenos relativamente pobres em íons como Ca^+ , Mg_2^+ , K^+ e Na^+ característicos da geologia da área (forma o Boa Vista) (MENESES; COSTA; COSTA, 2007) e do tipo de água (clara) (SIOLI, 1990).

A condutividade elétrica apresentou maior varia o nos lagos que nos igarapés, mostrando ter alguma rela o 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 deposi o de sedimentos e de reten o de nutrientes das  guas que extravasam do leito dos rios na época das chuvas, possuindo assim, uma maior quantidade de material em decomposi o (EPE, 2010), o que pode justificar a varia o 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 Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - 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_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; Sander (2012) ao avaliar 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 (2010) 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; 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

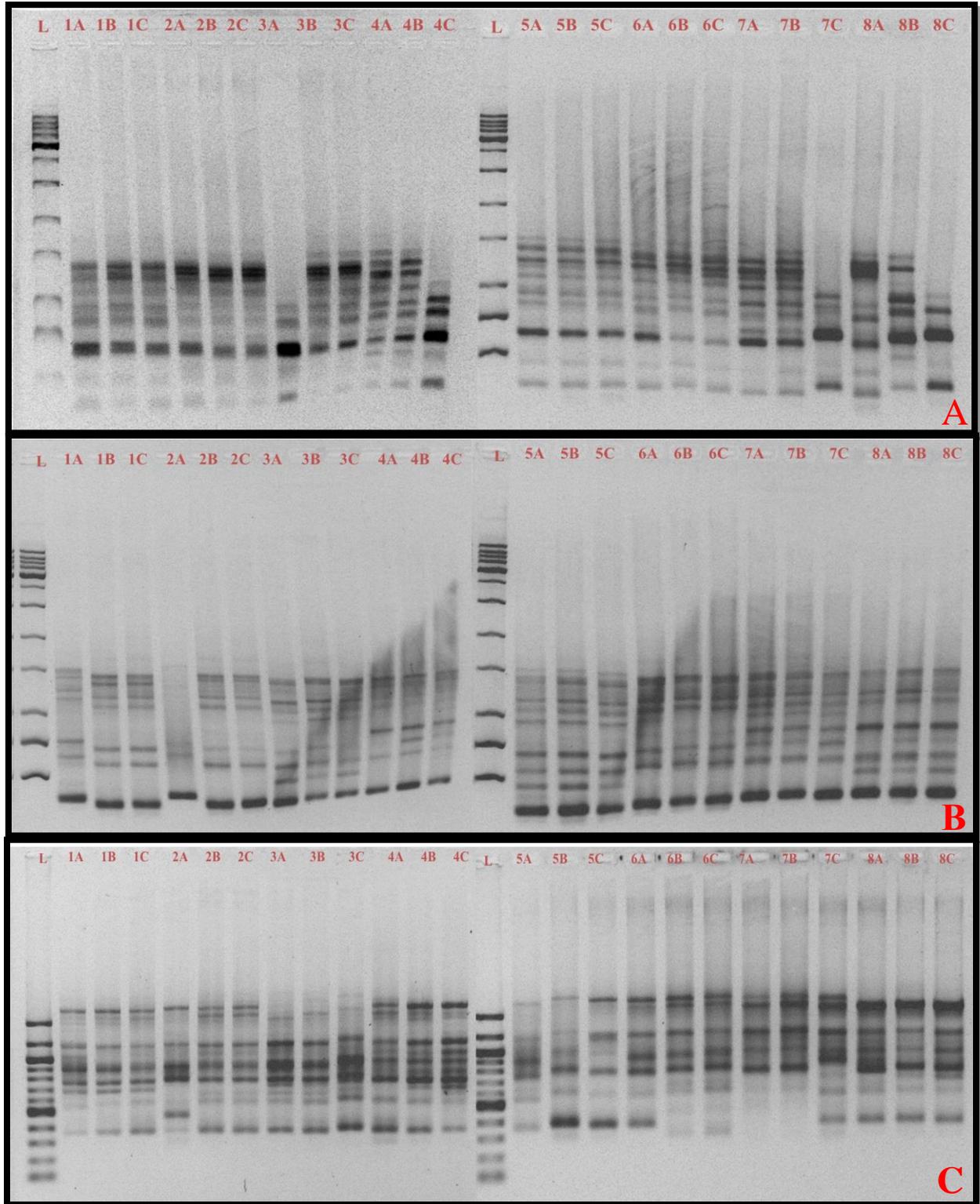
Entre os 21 iniciadores ISSR que produziram ampliações, três apresentaram fragmentos de boa intensidade (Tabela 4). Os iniciadores utilizados geraram um total de 43 locos polimórficos e dois monomórficos.

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

Figura 5 - Padrão do gel de agarose com o perfil dos fragmentos produzidos pelos indivíduos de *N. rudgeana*. 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.

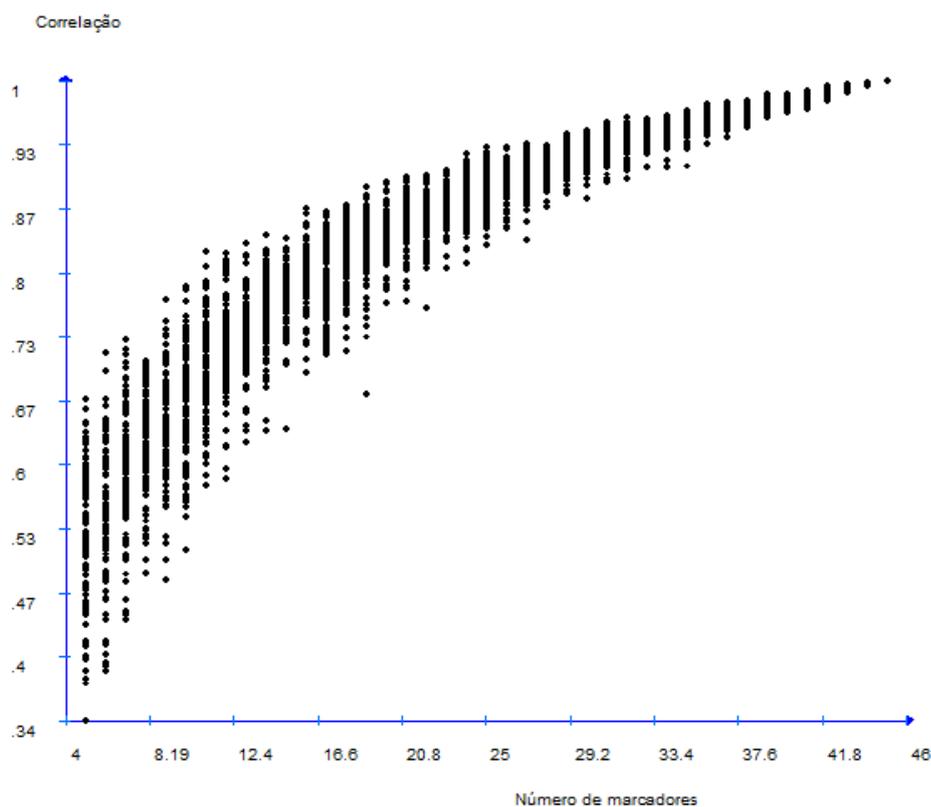
Neste trabalho esta classe de marcadores também se mostrou eficaz para caracterizar indivíduos de *N. rudgeana*, pois a proporção de locos polimórficos foi bastante elevada (94,8%). Em plantas uma das primeiras constatações do uso de sequências repetitivas para análise do DNA foi feita por Nybom et al. (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 6 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 6 - 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; 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 análise de variância molecular (AMOVA) para as oito populações de *N. rudgeana*.

Tabela 5 - Análise de variância molecular 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., 2013).

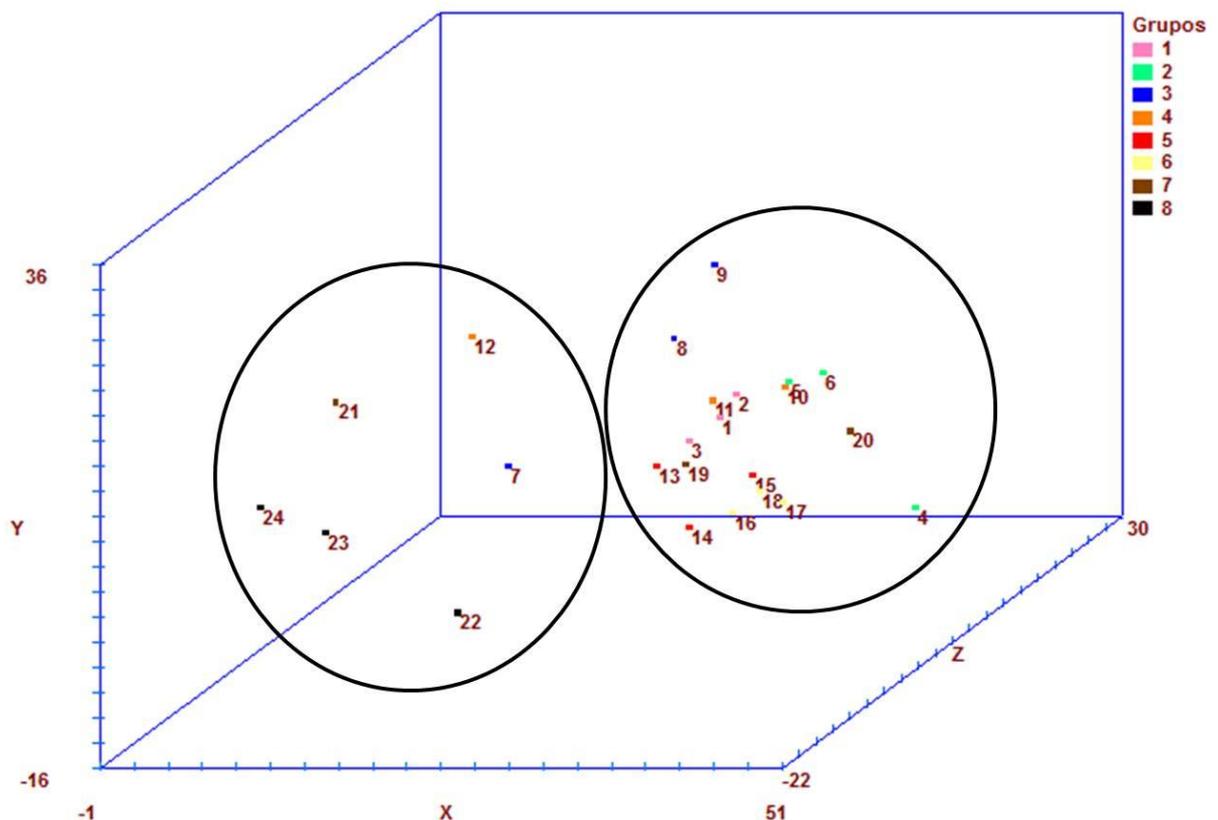
Dong; Gituru; Wang (2010) ao analisarem a variabilidade genética de *Ceratopteris pteroides* (Hook.) Hieron., ao contrário do trabalho anteriormente citado, encontraram uma variação de 69,08% dentro das populações, atribuindo este fato ao tipo de dispersão da espécie (por esporos).

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 7) da dissimilaridade entre os 24 acessos analisados e construído o dendograma pelo método UPGMA (Figura 8). 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 7 - 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 8 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 (NETO; COSTA, 2010), sendo uma característica que pode favorecer a não diferenciação na composição genética entre lagos e igarapés.

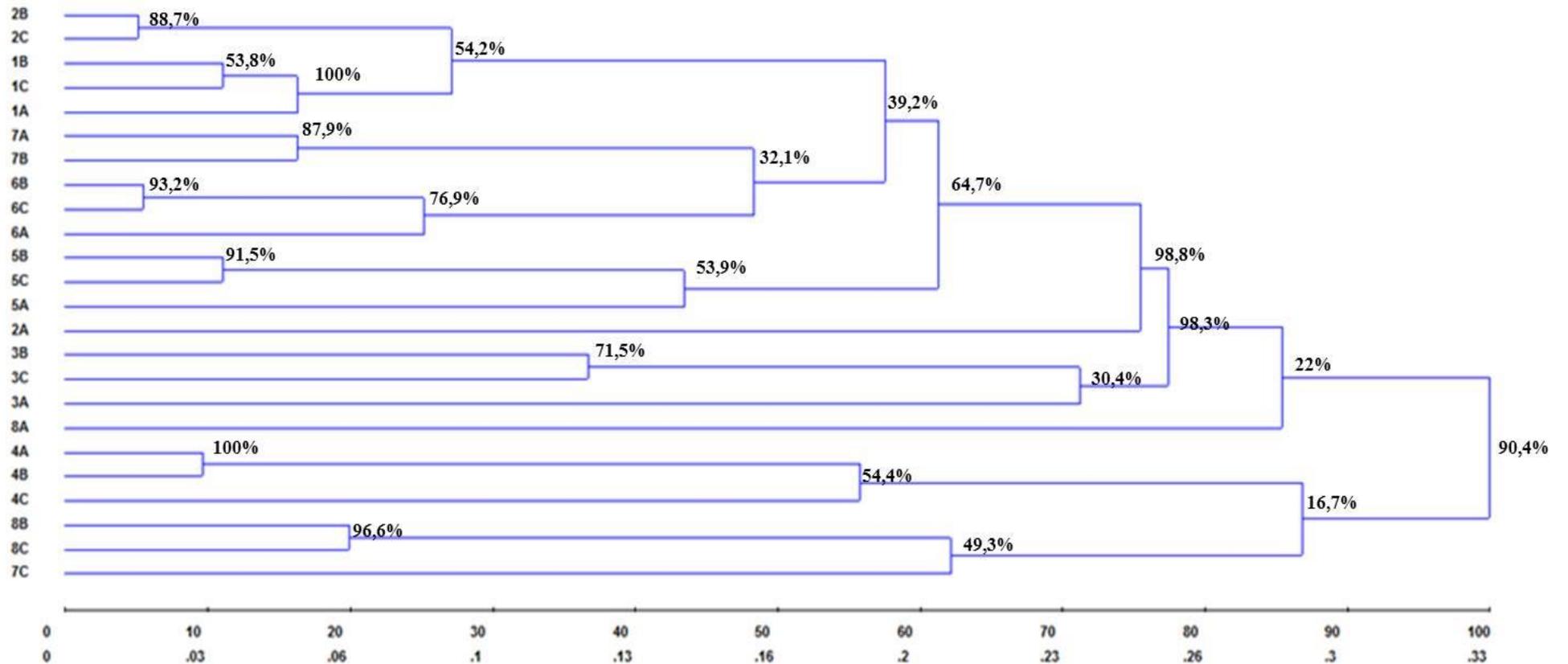
Analisando o dendograma nota-se a formação de dois grandes grupos com 90,4% de consistência. O primeiro nó uniu a maior parte dos acessos dos ambientes 1, 2, 3, 5, 6 e 7 que fazem parte das regiões Norte, Oeste e Leste formando o grupo 1. O segundo nó uniu os acessos dos ambientes 4 e 8 formando o grupo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

Ao observar o mapa (Figura 3) 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.

Ressaltamos 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 8 – 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 (Figura 9).

O eixo 1 da composição limnológica 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 ($r^2 = 76\%$; $p = <0,01$).

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.

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.

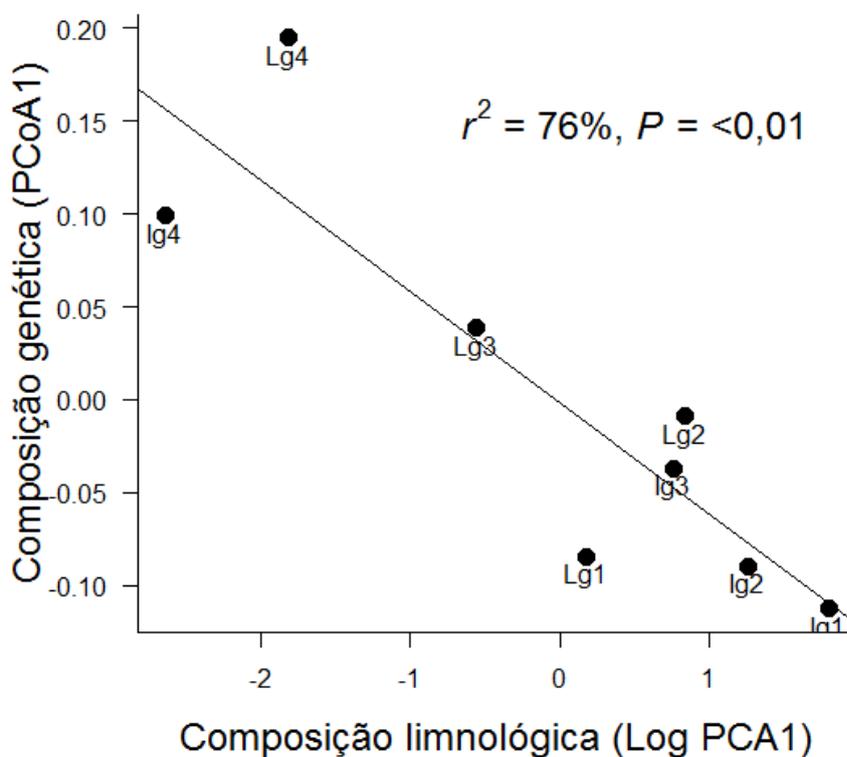


Tabela 6 - Correlação dos parâmetros limnológicos com o eixo 1 da análise de componentes principais (PCA).

Variável	Loadings
pH	-0.01018233
Alcalinidade	-0.39547515
O ₂	-0.32455657
Condutividade	0.21214614
NO ₃	-0.44581965

Variável	Loadings
NH ₃	0.21771951
NO ₂	0.45182035
PO ₄	0.37097939
Profundidade	-0.32438943

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).

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 (NH₄⁺, NH₃, N₂, N₂O, NO, NO₂⁻ e NO₃⁻) 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 então todas 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.

Algum 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

Os lagos e igarapés analisados apresentaram diferenças entre os valores de pH, condutividade elétrica, amônia, ortofosfato e profundidade. Através dos parâmetros medidos e das observações efetuadas não foram constatados níveis de poluição alarmante, sendo considerados ambientes bem preservados apesar de cada local possuir alguma interferência antrópica.

Os resultados da AMOVA demonstram que a maior parte da variabilidade genética da *N. rudgeana* se encontra dentro das populações (52,09%), enquanto 47,91% é decorrente de variação interpopulacional. A espécie em estudo apresenta 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. 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.

Não foi encontrada 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.

Esta separação em dois grupos, 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

- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **MEGADIVERSIDADE**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 70-78, Jul. 2005.
- ALBUQUERQUE, B. W. P. Plantas Forrageiras da Amazônia: I - aquáticas flutuantes. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 11, n. 3, p. 457-471, jul./set. 1981.
- ALMEIDA, C. M. A. et al. Caracterização molecular de cultivares de Cana-de-Açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, [s.n.], p. 1771-1776, 2009. Edição especial.
- ALMEIDA, S. S.; AMARAL, D. D.; SILVA, A. S. L. Análise florística e estrutura de florestas de Várzea no estuário amazônico. **Acta amazonica**, Manaus, v. 34, n. 4, p. 513-524, out./dez. 2004.
- AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V. **Laguinhos: Mini-ecossistemas para escolas e jardins**. Ribeirão Preto: Holos, 2002. 88p.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v.161, n. 2, p. 105–121, out. 2009.
- 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.
- AVISE, J. C. et al. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Reviews: Ecology, Evolution, and Systematics**, [S.l.], v. 18, [s.n.], p. 489-522, nov. 1987.
- AYRES, M., M. et al. **Bioestat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Ong Mamirauá, 2007. 380p.
- BARBOSA, K. M. N.; PIEDADE, M. T. F.; KIRCHNER, F. F. Estudo temporal da vegetação herbácea da várzea da Amazônia Central. **Floresta**, Curitiba, v. 38, n. 1, p. 89-96, jan./mar. 2008.
- 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. et al. The “Lavrados” of Roraima: Biodiversity and Conservation of Brazil’s Amazonian Savannas. **Functional Ecosystems and Communities**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 29-41, 2007.
- BARBOSA, R. I.; CAMPOS, C. Detection and geographical distribution of clearing areas in the savannas (‘lavrado’) of Roraima using Google Earth web tool. **Journal of Geography and Regional Planning**, [S.l.], v.4, n.3, p. 122-136, mar. 2011.

- 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, [s.n.], p.119-130, ago. 2006.
- BEYRUTH, Z. Aquatic macrophytes from a marginal pond at Embu-Mirim river, São Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.26, n. 4, p.272-282, ago. 1992.
- 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.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 1998. 453p.
- BOVE, C. P. et al. Hidrófitas fanerogâmicas de ecossistemas aquáticos temporários da planície costeira do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p.119-135, jan./mar. 2003.
- 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.
- BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais**. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal / Manejo Ambiental) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- 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.
- CAMPOS, C.; PINTO, F.; BARBOSA, R. I. **O Lavrado de Roraima: importância biológica, desenvolvimento e conservação na maior savana do Bioma Amazônia**. Boa Vista: INPA, 2008. Disponível em: <http://agroeco.inpa.gov.br/reinaldo/RIBarbosa_ProdCient_Usu_Visitantes/2008Diagnostico_LAVRADO_MMA.pdf>. Acesso em: jun. de 2014.
- CARPENTER, S. R. Enrichment of Lake Wingra, Wisconsin, by submersed macrophyte decay. **Ecology**, [S.l.], v. 61, n.5, p.1145–1155, 1980
- CARRANZA, T. T. **Flora e fitossociologia de áreas circundantes a lagos naturais de savanas próximas à cidade de Boa Vista – RR**. 2006. 44f. Monografia (Pós-graduação em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006.
- CARVALHO, C. M. O lavrado da Serra da Lua em Roraima e perspectivas para estudos da herpetofauna na região. **Revista Geográfica Acadêmica**, [S.l.], v.3, n.1, p. 4-17, 2009.

CAVALLARI, M.M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação.** 2004. 106p. Dissertação (Mestrado - 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.

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.

COMPAINHA DE PESQUISAS DE RECURSOS MINERAIS – CPRM. **Carta Geológica - Folha Roraima Central.** Manaus: Superintendência Regional de Manaus - SUREG/MA, 1998. 1 mapa, color., 89,2 x 67,9 cm. Escala: 1:500.000.

COMPAINHA DE PESQUISAS DE RECURSOS MINERAIS – CPRM. **Zoneamento Ecológico-Econômico da Região Central do Estado de Roraima.** Tomo I. Boa Vista: FEMACT, 2002. CD-ROM.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Índice de qualidade da água.** Disponível em: www.cetesb.gov.br/agua. Acesso em: jul. de 2014.

CONARD, H.S. **The waterlilies: a monograph of the genus *Nymphaea*.** Washington: Publications of the Carnegie Institutions of Washington, 1905. 424p.

COSTA, S. R. A. G. **Técnicas de estudo micromorfológico e molecular aplicadas ao gênero *Hypericum*.** 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agronômica – Protecção de Plantas) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

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.

CUNHA-SANTINO, M. B.; PACOBAHYBA, L. D.; BIANCHINI, I. JR. Decomposition of aquatic macrophytes from Cantá stream (Roraima, Brazil): kinetics approach. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 22, n. 2, p. 237-246, 2010.

- DKHAR, J. et al. Molecular phylogenetics and taxonomic reassessment of four Indian representatives of the genus *Nymphaea*. **Aquatic Botany**, [S.l.], v. 93, n. 2, p. 135-139, ago. 2010.
- 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.
- EATON, A. D. et al. (Eds.) **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21 ed. Estados Unidos: American Public Health Association – APHA, 2005. Disponível em [http://www.standardmethods.org.]. Acesso em: jul. de 2014.
- EMPRESA DE PESQUISAS ENÉRGICAS – 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: jul. de 2014.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP, 1998. 575p.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP, 2011. 826p.
- ESTEVES, F. A.; CAMARGO, A. F. M. Sobre o papel das macrófitas aquáticas na estocagem e ciclagem de nutrientes. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 1, n.1, p. 273-298, jan./mar. 1986.
- 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.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Brasília: Embrapa, 2007. 102p.
- 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, C. S. et al. **Plant reproduction in the Central Amazonian floodplains: challenges and adaptations**. Estados Unidos: AoB PLANTS, 2010. Disponível em: <<http://aobpla.oxfordjournals.org/content/2010/plq009.full>>. Acesso em: jun. de 2014.
- FERREIRA, F. A. et al. Acumulação de fluoreto por macrófitas aquáticas. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 6, n. 3, p. 38-35, set./dez. 2011.

FERREIRA, L. V.; ALMEIDA, S. S.; SILVA, A. S. As vegetações sujeitas a influência da planície de inundação na Floresta Nacional de Caxiuanã. In: Colóquio Ecologia da Floresta Amazônica: Ambientes, Gente & Plantas, 2011, Belém. **Anais...** Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi.

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

FRACARO, F. **Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo in vitro de *Hesperozygis ringes* Benth.**. 2006. 104f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

FURCH, K.; JUNK, W. J. Dinâmica de nutrientes de decomposição submersa amazônica da planta herbácea *Paspalum fasciculatum* e *Echinochloa polystachya*. **Revue d'Hydrobiologie Tropicale**, França, v. 25, [s.n.], p. 75-85, 1992.

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-MS: Embrapa Pantanal, 2000. p. 1-26.

GOMES, C. C.; MOURA, T. M. Estrutura genética em populações de plantas do cerrado. **Revista Agrotecnologia**, Goiás, v. 1, n. 1, p. 33-52, 2010.

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: XIX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 19, 2011. **Anais...** Maceió: Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 2011.

GONÇALVES, C. V. et al. Application of a non-destructive method to determine biomass in Pontederiaceae. **Acta Limnologia Brasiliensia**, Rio Claro, v. 22, n. 4, p. 361-366, 2010.

GONZÁLES, A.; AGUIRRE, X. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). In: EGUIARTE, L.; SOUZA, V.; AGUIRRE, X. (Eds.). **Ecología Molecular**. México: Instituto Nacional de Ecología, 2007. p. 567-571.

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**. Califórnia: 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.; CLEGG, M. T. ; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. [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.
- HESLOP-HARRISON, Y. *Nymphaea* L. **Journal of Ecology**, [S.l.], v.43, n.2, p. 719-734, jul. 1955.
- 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.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, v. 56, p. 1-11, 1996.
- JAIN, S. K.; BRADSHAW, A. D. Evolutionary divergence among adjacent plant populations. 1. the evidence and its theoretical analysis. **Heredity**, London, v. 21, [s.n.], p. 207- 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.
- JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 3. ed. Sunderland: Sinauer, 2007. 620p.
- JUNK, W. J. As águas da região amazônica. In: SALATI, E.; SHUBART, H. O. R.; JUNK, W.; OLIVEIRA, A. E. (Eds.) **Amazônia: desenvolvimento, integração e ecologia**. São Paulo: Brasiliense/Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 1983. p. 45-100.
- JUNK, W. J.; FURCH, K. Química da água e macrófitas aquáticas de rios e igarapés na Bacia Amazônica e nas águas adjacentes. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 10, n. 2, p. 611 – 635, abr./jun., 1980.
- JUNK, W. J.; PIEDADE, M. T. F. Biomassa e produção primária do estrato herbáceo de plantas na planície amazônica. **Hydrobiologia**, v. 263, n. 3, p. 155-162, jul. 1993.
- KRUSKAL, J. B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1–27, mar. 1964.
- LAMOTE, V. et al. Evaluation of AFLP markers to reveal genetic diversity in *Typha*. **Aquatic Botany**, [S.l.], v.83, n. 4, p. 296-309, dez. 2005.
- LES, D. H. et al. Phylogeny, classification and floral evolution of water lilies (Nymphaeaceae; Nymphaeales): A synthesis of non-molecular, rbc1, matK, and 18S rDNA data. **Systematic Botany**, Nova York, v. 24, n. 1, p. 28-46, 1999.
- LOPES, M. S. et al. Genetic diversity of an Azorean endemic and endangered plant species inferred from ISSR markers. **AoB PLANTS**, Jun. 2014. Publicado on-line. Disponível em: <http://aobpla.oxfordjournals.org/content/early/2014/06/26/aobpla.plu034.long>. Acesso em: jul. de 2014.

LOPES, R. et al. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência & Desenvolvimento**, [S.l.], v.5, n.29, p. 56-60, dez./jan. 2002.

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 (Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

MENESES, M. E. N. S. **Os lagos do entorno da cidade de Boa Vista – Roraima, aspectos fisiográficos, granulométricos, mineralógicos e químicos dos sedimentos e físico-químicos das águas**. 2006. 116f. Dissertação (Mestrado em Geologia e Geoquímica) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

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.

MIRANDA, I. S. ABSY, M. L. A flora fanerogâmica das savanas de 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. 445-455.

MOURA-JÚNIOR, E. G. **Resposta quali-quantitativa da flora aquática vascular à alteração do regime hidrológico em reservatórios do Nordeste do Brasil**. 2012. 86p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

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**. 4ed. New York - USA: Macmillan Higher Education. 2004. 1100p.

NETO, R. A. R.; 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.

NEVES, M. A. **Composição, riqueza e variação espaço-temporal de macrófitas aquáticas do lago do trevo – município de Boa Vista – RR**. 2007. 128f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2007.

NODA, H.; JUNK, W. J.; PAHLEN, A. Emprego de macrófitas aquáticas (“Matupá”) como fonte de matéria orgânica na cultura de feijão-de-asa (*Psophocarpus tetragonolobus*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 8, n. 1, p. 107 – 109, jan./mar. 1978.

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. **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**, [S.l.], v. 3, [s.n.], p. 93-114. 2000.

PAIVA, R. M. S. **Levantamento florístico e obtenção do material genético de macrófitas aquáticas das grades do PPBio – Roraima**. 2012. 75f. Monografia (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.

PEIXOTO, A. R.; COSTA, C. S. B. Produção primária líquida aérea de *Spartina densiflora* Brong. (Poaceae) no estuário da laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA**, Porto Alegre, v. 59, n. 1, p. 27-34, jan./jun. 2004.

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.

PIEPADE, M. T. F. et al. Aquatic herbaceous plants of the Amazon floodplains: state of the art and research needed. **Acta Limnologica Brasiliensis**, Rio Claro, v. 22, n. 2, p. 165-178, 2010.

PINHEIRO, M. N. M. ; HORTENCIO, M. M. ; EVANGELISTA, R. A. O. Distribuição Espacial da Biodiversidade de Macrófitas Aquáticas Nos Lagos da Região Nordeste do Estado de Roraima. **Revista GeoNorte**, [S.l.], v. 01, [s.n.], p. 162-174, 2012.

PISTORI, R. E. T. **Crescimento das macrófitas aquáticas flutuantes *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms, *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia molesta* (Mitchell) em diferentes concentrações de nutrientes**. 2009. 79f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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.

POMPÊO, M. L.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Macrófitas aquáticas e perifiton: Aspectos ecológicos e metodológicos**. São Carlos: Rima, 2003. 124p.

POTT, V. J. A família Nymphaeaceae no pantanal, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 183- 194, 1998.

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, 2000. 404p.

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.

PRANCE, G. T.; ÁRIO, J. R. Um estudo da biologia floral de *Victoria amazonica* (Poepp.) Sowerby (Nymphaeaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 5, n. 2, p. 109-139, abr./jun. 1975.

ROCHA, C. M. C. et al. Macrófitas Aquáticas como Parâmetro no Monitoramento Ambiental da Qualidade da Água. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 5, n. 4, p. 970-983, 2012.

ROCHA, O. **Avaliação do estado de conhecimento sobre a diversidade biológica no Brasil: Águas Doces (Versão Preliminar)**, 2003. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/aguadoc1.pdf>>. Acesso em: 16 de dez. de 2012.

RODRIGUES, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 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.

ROSSETO, M.; WEAVER, P. K.; DIXON, K. W. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). **Molecular Ecology**, [S.l.], v.4, n.3, p.321-330, jun. 1995.

ROTTA, E.; BELTRAMI, L. C. C.; ZONTA, M. **Manual de prática de coleta e herborização de material botânico**. Colombo: Embrapa florestas, 2008. 31p.

SÁNCHEZ-BOTERO, J. I. et al. Ictiofauna associada às macrófitas aquáticas *Eichhornia azurea* (SW.) Kunth. e *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. no lago Camaleão, Amazônia Central, Brasil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 369-375, 2003.

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, F. R.; GUIMARÃES, P. E. M.; REDONDO, R. A. F. Bancos de DNA: Coleções estratégicas para uso da biodiversidade. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 93-98, 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.

SCHAEFER, C. E. R.; VALE JÚNIOR, J. F. Mudanças Climáticas e evolução da paisagem em Roraima: uma Resenha do Cretáceo ao Recente. In: BARBOSA, R. I.; FERREIRA, E. J. G.; CASTELLÓN, E. G. (Eds.). **Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima**. Manaus: INPA, 1997, p. 231-265.

- SCHAFFER, A. **Fundamentos de Ecologia e Biogeografia das Águas Continentais**. Porto Alegre: ed. UFRGS, 1985. 532p.
- SCREMIN-DIAS, E. O retorno à origem aquática. In: SCREMIN-DIAS, E.; POTT V. J.; HORA, R. C.; SOUZA, P. R. (Org.). **Nos jardins submersos de Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região**. Campo Grande: UFMS, 1999. p. 24-42.
- SEPLAN. **Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento de Roraima. Informações Socioeconômicas do Município de Boa Vista – RR**. Boa Vista: CGEES/SEPLAN - RR, 2010a. 68p.
- SEPLAN. **Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento de Roraima. Informações Socioeconômicas do Município do Cantá – RR**. Boa Vista: CGEES/SEPLAN - RR, 2010b. 62p.
- SEPLAN. **Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento de Roraima. Informações Socioeconômicas do Município do Bonfim – RR**. Boa Vista: CGEES/SEPLAN - RR, 2010c. 61p.
- 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 fitoplânctônica em ambientes lacustres do estado de Roraima, Brasil**. 2008. 93f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.
- SIMPSON, M. G. **Plants systematic**. 2. ed. Oxford: Elsevier, 2010. p. 740.
- SIOLI, H. **Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais**. 2. ed. Petrópolis: Vozes, 1990. 72p.
- SOUSA, D. J. L.; MATIAS, L. Q. Sinopse do gênero *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae) no Estado do Ceará. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 3, p. 72-78, jul./set. 2012.
- 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.
- 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. 640p.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 640p.
- 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.
- THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. Maringá: Eduem, 2003. 342p.
- THORNE, R. F. The classification and geography of the flowering plants: Dicotyledons of the class Angiospermae. **The Botanical Review**, Nova York, v. 66, n. 4, p. 441-647, 2000.
- TREVELIN, L. C. et al. **Diversidade local de macrófitas aquáticas em águas brancas e pretas na Amazônia Central**, Manaus: INPA, 2007. Disponível em: <pdbff.inpa.gov.br/cursos/efa/livro/2007/pdf/varzea/va_po3g2.pdf>. Acesso em: 13 de maio de 2012.
- 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, [s.n.], p. 73–77, 2006.
- VAL, A. L. et al. Amazônia: Recursos Hídricos e Sustentabilidade. In: BICUDO, C. E. M.; TUNDISI, J. G.; SCHEUENSTUHL, M. C. B. (Eds.). **Águas do Brasil: Análises Estratégicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2010. p. 95-109.
- VALE JÚNIOR, J. F.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Solos sob savanas de Roraima: Gênese, classificação e relações ambientais**. Boa Vista: Ioris, 2010. 219p.
- VASCONCELOS, M. C. **Classificação de rios e sua relação com a comunidade de macroinvertebrados em riachos**. 2012. 182p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- VIANNA, R. C.; VIANNA JUNIOR, C. C.; VIANNA, R. M. Os recursos de água doce no mundo – situação, normatização e perspectiva. **Revista Âmbito Jurídico**, Rio Grande, v. 8, n. 23, nov. 2005. Disponível em: <http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?artigo_id=215&n_link=revista_artigos_leitura>. Acesso em jul 2014.
- VIEIRA, M. D. F. Abundance and biomass of *Paulinia acuminata* (De Geer, 1773) (Orthoptera: Pauliniidae) in a varzea lake of Central Amazonia. **Amazoniana**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 337 – 352, 1992.
- VITOUSEK, P. M. et al. Human Domination of Earth's Ecosystems. **Science**, Nova York, v. 277, n. 5, p. 494-499, out. 1997.

VON SPERLING, E. **Introdução a Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos**. 2ªed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária: UFMG, 1996. 243p.

WETZEL, C. E. **Biodiversidade e distribuição espacial de diatomáceas (Bacillariophyceae) na bacia hidrográfica do Rio Negro, Amazonas, Brasil**. 2011. 3v. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

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, [s.n.], 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.

YOO, M. J. et al. Divergence times and historical biogeography of Nymphaeales. **Systematic Botany**, Nova York, v. 30, n. 4, p. 693-704, 2005.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, [S.l.], v. 20, n.2, p. 176-183, mar. 1994.

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	7,5	6,42	0,217	0,097	0	0,222	1,0
	Jan.	6	8	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	7,5	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	7,5	8,48	0,216	0,023	0	0,778	1,2
	Jan.	6	20	7,8	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	7,4	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