

## Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Trema micrantha* (L.) B.

### Genetic and diversity structure in natural populations of *Trema micrantha* (L.) B.

Luciano Arruda Ribas  
Paulo Yoshio Kageyama

**RESUMO:** A diversidade e estrutura genética foram estudadas em populações da espécie pioneira *Trema micrantha*. As populações foram amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus (Gália, SP) e na Reserva Florestal Santa Genebra (Campinas, SP), onde se amostraram 177 indivíduos distribuídos em 6 e 5 subpopulações, nos respectivos fragmentos. A partir das frequências gênicas estimadas do padrão de polimorfismo de aloenzimas para a espécie, quantificou-se a distribuição da diversidade genética nas suas populações. Nesta etapa, somaram-se oito locos polimórficos, num total de 20 alelos. Verificou-se que as populações mantêm baixos níveis de endogamia ( $\hat{f} = -0,204$  e  $0,066$ ) e alta diversidade ( $\hat{H}_e = 0,373$  e  $0,392$ ). A divergência genética estimada entre populações foi menor do que entre subpopulações ( $\hat{\theta}_p = -0,007$ ,  $\hat{\theta}_{sp} = 0,068$ ). Os resultados sugerem forte seleção atuando dentro de clareiras, favorecendo a manutenção de elevada heterozigosidade na população do fragmento mais alterado. Isso mostrou que a distribuição espacial em clareiras é importante para preservar a diversidade genética e que a participação dos agentes dispersores de sementes é fundamental na manutenção do fluxo gênico nesta espécie pioneira.

**PALAVRAS-CHAVE:** Espécie pioneira arbórea, Eletroforese de isoenzimas

**ABSTRACT:** Genetic diversity and structure were studied in populations of a pioneer tree species *Trema micrantha*. The study was conducted in populations within the Estação Ecológica dos Caetetus (Gália, São Paulo State, Brazil) and the Reserva Florestal de Santa Genebra (Campinas, São Paulo State, Brazil). In total, 177 plants from six subpopulations in Gália and five subpopulations in Campinas were sampled. Eight polymorphic loci with 20 alleles were used to estimate genetic diversity and structure. The populations showed low levels of inbreeding ( $\hat{f} = -0.204$  and  $0.066$ ) and high diversity index ( $\hat{H}_e = 0.373$  and  $0.392$ ). The genetic divergence among populations was lower than among subpopulations ( $\hat{\theta}_p = -0.007$ ,  $\hat{\theta}_{sp} = 0.068$ ). These results suggest a strong selection acting within gaps and favoring the maintenance of high heterozygosity in the population of the most altered fragment. This showed that spatial distribution in gaps is important to preserve the genetic diversity and that seed dispersal agents are important for the maintenance of gene flow in this species.

**KEYWORDS:** Pioneer tree specie, Electrophoresis of isoenzyme

## INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas sobre a dinâmica de florestas tropicais têm sido desenvolvidas de forma acelerada devido à grande pressão antrópica sobre seus ecossistemas. Por apresentar alto nível de diversidade biológica, é um grande desafio entender sua estrutura, considerando a organização das comunidades, a dinâmica das populações, bem como as especiações e as variações fisiológicas que atribuem características demográficas

e comportamentais que sustentam toda sua complexidade. Sobretudo, a dinâmica da regeneração tem merecido particular atenção devido à sua importância no manejo florestal (Bazzaz, 1991).

Têm-se observado muitas mudanças na composição de espécies de comunidades florestais, resultantes da constante fragmentação dos contínuos florestais (Murcia, 1995). Percebe-se que, com a fragmentação, ocorre imediata redução no número de indivíduos de cada espécie e do tama-

nho médio de suas populações. Como os indivíduos podem se tornar restritos a pequenos fragmentos, pode ocorrer isolamento espacial entre as populações remanescentes. Tais alterações refletem nos processos de deriva genética, fluxo gênico, seleção e no sistema de cruzamentos. Sendo esses processos determinantes do grau de diversidade genética na espécie, bem como sua distribuição entre indivíduos e populações, os principais efeitos genéticos da fragmentação florestal são a diminuição da diversidade genética nas populações e espécies, a mudança na estrutura genética populacional e o aumento da endogamia, que acarretam fortes prejuízos às populações de espécies florestais (Young e Boyle, 2001; Primack e Rodrigues, 2001).

Por outro lado, estimativas de fluxo gênico interpopulacional, por métodos indiretos, têm indicado elevadas incidências de troca gênica entre populações distantes, mesmo considerando centenas de quilômetros (Hamrick e Loveless, 1989). Similarmente, as estimativas diretas da distância de dispersão de pólen e sementes, em florestas primárias, mostram que o fluxo gênico é realmente eficiente, destacando-se espécies que interagem com agentes dispersores com grandes áreas de forrageamento (Loveless, 1992; Boshier et al., 1995). Dessa forma, as possíveis consequências da fragmentação da floresta variam em relação às características de história de vida, abundância, longevidade e sistema de cruzamento das espécies arbóreas. Além disso, os efeitos podem ser diferentes e mais complicados, devido às interações com as demais espécies que, também, podem estar sofrendo os efeitos dessa fragmentação.

O processo de sucessão ecológica envolve um conceito amplo que pode servir como critério para classificar as espécies em grupos básicos como pioneiras, secundárias e clímax (Budowski, 1965). Sob o ponto de vista de paisagens fragmentadas, as espécies pioneiras têm-se tornado cada vez mais freqüentes nas florestas e, também, fora delas. Nas florestas, sua presença está associada à taxa de substituição de árvores, subentendendo abertura de clareiras de diferentes dimensões, por vários motivos (Whitmore, 1991). Fora das florestas, além das espécies pioneiras estarem presentes em pequenas manchas de vegetação na paisagem, a maioria apresenta características desejáveis para compor diversos tipos de programas de restauração da cobertura vegetal, estando cada vez mais presentes fora das suas condições naturais.

Espécies pioneiras apresentam características próprias de extinção local e recolonização, o que pode contribuir, efetivamente, para o aumento do fluxo gênico, reduzindo a diferenciação genética entre populações (Slatkin, 1985, 1987). A existência de banco de sementes e a longa distância de dispersão de pólen e sementes apresentam importantes consequências genéticas e ecológicas para as espécies. Exemplos claros são os bancos de sementes que podem agir como tampão gênico devido à capacidade de repor a variação genética, perdida pela população de plantas após a extinção local, e a longa distância de dispersão de sementes e pólen que podem reduzir a distância genética entre populações geograficamente distantes (Alvarez-Buylla e Garay, 1994). Sob esse aspecto, torna-se importante o conhecimento da estrutura genética de populações de espécies pioneiras. Este conhecimento constitui subsídios para o melhor planejamento do seu manejo, de programas de coletas de sementes para restauração de áreas degradadas, bem como da formação de corredores de fluxo gênico.

Uma das formas mais utilizadas para avaliar a diversidade genética em populações naturais é baseada no estudo do polimorfismo por meio de eletroforese de isoenzimas em locos que codificam proteínas específicas. Com essa técnica é, também, possível esclarecer a distribuição dessa variabilidade nas populações em estudo (Alfenas et al., 1998).

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar e esclarecer o padrão de distribuição da diversidade genética em populações de *Trema micrantha* com base no polimorfismo revelado através da eletroforese de isoenzimas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram amostradas populações de *Trema micrantha* (L.) B., representativa da Mata Atlântica. Esta espécie ocorre em variados tipos de ambientes, exceto nos mais úmidos. É uma das primeiras espécies a se estabelecer em áreas abandonadas, continuando a existir em todos os estágios da sucessão secundária, exceto na floresta madura (Lorenzi, 1992). Ela ocorre, naturalmente, entre as latitudes 30oN (Estados Unidos) e 30oS (Brasil) e é classificada como hermafrodita críptica, por apresentar indivíduos variando de monóicos a dióicos e suas flores serem unissexuadas ou bissexuadas andrógenas (Torres, 1996). Seus

grãos de pólen são dispersos pelo vento, sendo suas flores, também, visitadas por pequenos insetos (Bawa et al., 1985), enquanto a dispersão das sementes é por zoocoria, principalmente por aves (Carvalho, 1994).

As populações foram amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus (EEC) e na Reserva Florestal de Santa Genebra (RMSG). A EEC está situada entre a latitude 22° 22' a 22° 27' Sul e longitude 49° 40' e 49° 43' Oeste, entre os municípios de Gália e Alvilândia, SP. Ela compreende uma área de 2.179 ha de floresta tropical latifoliada semidecídua, com características primárias e espécies típicas desse tipo de floresta, do centro-oeste do Estado. Nela, encontram-se árvores com alturas de até 25 a 30 m e DAP de 1 m. A flora local é considerada praticamente intacta, representando um dos maiores e mais conservados remanescentes deste tipo de floresta em todo o Estado de São Paulo (Perecin, 2000).

A RMSG abrange 251,8 ha de floresta tropical estacional semidecídua (IBGE, 1993), localizados nas coordenadas 22° 49' 45" S e 47° 06' 33" W, no município de Campinas, SP. Nessa área, levemente ondulada, com altitudes variando de 580 a 610 m, verifica-se um mosaico de vegetação onde várias fases sucessionais são encontradas. Ocorrem tanto áreas com floresta preservada, formando um dossel contínuo de 15 a 18 m de altura, com espécies emergentes de até 25 m, quanto áreas muito perturbadas, ocupadas por espécies de estágio sucessional inicial. Além destas, encontram-se áreas com solos permanentemente encharcados, ocupados por uma Floresta Paludosa. Neste pequeno fragmento, além dos processos naturais que estimulam a regeneração, ocorreram perturbações antrópicas como queimadas, extração seletiva de madeira e corte raso de alguns trechos para extração da lenha (Leitão-Filho, 1995).

Amostraram-se 178 indivíduos de *T. micrantha*, sendo que 96 representaram a população da RMSG e 82 da EEC. As amostragens foram realizadas considerando indivíduos presentes em diferentes clareiras como subpopulações dentro de cada população. A população da EEC foi amostrada em cinco subpopulações, sendo quatro ao longo de uma estreita estrada que corta, longitudinalmente, todo o fragmento e uma quinta subpopulação em um pequeno fragmento distante 1,7 km da borda do fragmento.

Na RMSG, a população foi amostrada com seis subpopulações, constituindo dois tipos de

clareiras. Quatro destas se caracterizaram como grandes áreas abertas, provavelmente pela extração de madeira e pela ocorrência de queimadas no passado recente. As demais subpopulações ocorriam em condição menos alterada, em pequenas clareiras formadas pela abertura de trilhas para visitação. As quatro primeiras subpopulações continham árvores mais distantes entre si, além de mais velhas do que nas últimas clareiras.

Para o estabelecimento de protocolos para as análises isoenzimáticas, coletaram-se folhas jovens de plantas adultas para análise genética em laboratório. As folhas foram acondicionadas em caixa de polietileno contendo gelo. O tecido foliar coletado foi macerado, utilizando-se o "tampão 1", citado em Alfenas et al. (1991). As amostras foram mantidas em "freezer", à temperatura de -80°C, na forma de "wicks", até o momento de serem submetidas à eletroforese. Esta foi realizada em géis de 400 ml contendo penetrose (34,29g) e amido de batata (18,29g). Inicialmente, testaram-se quatro sistemas tampão gel/eletrodo com 32 sistemas enzimáticos (Ribas e Kageyama, 2001).

Foram reveladas as enzimas malato desidrogenase (MDH, EC-1.1.1.37), glucose desidrogenase (GDH, EC-1.1.1.47), xiquimato desidrogenase (SKDH, EC-1.1.1.25), NADH-desidrogenase (NADHDH, EC-1.6.99.3), diaforase (DIA, EC-1.8.1.4), menadiona redutase (MR, EC-1.6.99.2), isocitrato desidrogenase (IDH, EC-1.1.1.42) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT, EC-2.6.1.1). A eletroforese foi realizada sob o sistema tampão gel/eletrodo número 25 (Alfenas et al., 1991). Nesta etapa, selecionaram-se oito locos polimórficos, totalizando 20 alelos.

A partir das frequências alélicas e genotípicas, foram obtidos os seguintes índices de diversidade genética intrapopulacional: número de alelos por locos (A), heterozigiosidade esperada sob as condições de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (E.H.W.) ou diversidade gênica (He), heterozigiosidade observada (Ho) e o coeficiente de endogamia intrapopulacional (f).

A estrutura genética, avaliada em três níveis hierárquicos, considerando indivíduos dentro de subpopulações dispostas nas populações da RMSG e da EEC, foi caracterizada pela análise da variância das frequências gênicas (Weir, 1996). Os parâmetros estimados foram: índice de fixação médio dentro das populações (*f*); índice de fixação total da espécie (*F*); coeficiente de coances-

tralidade entre indivíduos dentro de populações ou divergência genética entre populações ( $\theta_p$ ) e coeficiente de coancestralidade entre indivíduos dentro de subpopulações ou divergência genética entre subpopulações ( $\theta_{sp}$ ). A significância estatística dos parâmetros foi estimada pelo intervalo de confiança com 95% de probabilidade, obtido por reamostragem bootstrap, utilizando-se 1.000 repetições sobre locos. Os referidos parâmetros e os bootstraps foram estimados com o auxílio do programa GDA de Lewis e Zaykin (2000).

O fluxo gênico aparente ( $\hat{N}_m$ ) entre subpopulações dentro de populações foi estimado de forma indireta, segundo método proposto por Crow e Aoki em 1984, o qual corrige os desvios que ocorrem em estimativas com pequeno número de populações:  $\hat{N}_m = (1/4\alpha)[1/\hat{F}_{ST} - 1]$ , em que  $\hat{N}_m$  corresponde ao número de migrantes por geração,  $\hat{F}_{ST}$  a divergência genética entre populações e  $\alpha$  a correção para o número de populações ( $n$ ), sendo:  $\alpha = [n/(n-1)]^2$ . Substituiu-se por para estimar o fluxo gênico entre subpopulações dentro de populações.

Para testar a hipótese de que a distribuição das frequências dos alelos é idêntica nas subpopulações estudadas, recorreu-se ao programa TFGA (Miller, 1997), o qual possibilitou utilizar a metodologia descrita por Raymond e Rousset (1995), empregando reamostragem numérica do tipo Cadeias de Markov. Este procedimento testa a homogeneidade do padrão de distribuição das frequências alélicas entre as subpopulações, analisando locos individuais e considera que as frequências em cada loco são independentes entre si. Para o procedimento, utilizaram-se 10 baterias de testes, com 1.000 permutações por bateria e 1.000 passos de desmemorização. Compararam-se todas as subpopulações aos pares.

## RESULTADOS

As frequências alélicas nos oito locos polimórficos analisados apresentaram variações entre as onze subpopulações estudadas (Tabela 1). No loco Mdh-1, o alelo a foi exclusivo para duas subpopulações de RMSG e o alelo b foi o mais frequente entre as populações estudadas, estando fixado na subpopulação 2 deste fragmento. O alelo a do loco Gdh-2 mostrou-se fixado em cinco subpopulações, enquanto este apresentou a mesma frequência que o alelo b na subpopulação 11. O alelo c do Skdh esteve presente nas cinco

subpopulações da EEC, enquanto o mesmo foi exclusivo da subpopulação 6, na RMSG.

O teste de diferenciação, com 95% de probabilidade foi significativo (Tabela 2). Dos 55 confrontos, 40% foi significativo, chamando-se atenção para as subpopulações 1-1, 1-2, 1-3 e 1-6. Por outro lado, a maioria dos confrontos indicou probabilidade de semelhança entre subpopulações. As combinações de subpopulações representando o mesmo fragmento indicaram resultados contrastantes entre os fragmentos estudados. Para as subpopulações da EEC, verificou-se semelhança entre as mesmas, mesmo para a subpopulação 2-5, que se encontra mais distante do fragmento. Por outro lado, 40% dos contrastes para as subpopulações da RMSG foram significativas. A subpopulação 1-1, mostrou-se distinta em relação à demais consideradas neste fragmento.

De forma geral, os resultados indicaram a existência de variações não ao acaso na distribuição das frequências gênicas, comparativamente entre as subpopulações da espécie estudada. As variações verificadas entre as subpopulações da RMSG não se repetiram entre as subpopulações da EEC.

As estimativas de heterozigosidade foram altas (Tabela 3). Nas populações da RMSG, a heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o = 0,446$ ) foi maior do que se esperava sob as proporções de E.H.W. ( $\hat{H}_e = 0,373$ ); mas foram menores na EEC (0,366 e 0,392, respectivamente), indicando excesso de homozigotos. Com base no número médio de alelos por locos, estimou-se que esta espécie apresenta 75% da heterozigosidade máxima possível nas populações estudadas (0,411 para o máximo de 0,548).

As estimativas do índice de fixação intrapopulacional foram positivas e próximas de zero para as populações da EEC (0,066), enquanto as referentes às localizadas na RMSG foram negativas (-0,204). As estimativas negativas indicam que está havendo favorecimento aos heterozigotos dentro das subpopulações analisadas, podendo indicar um processo de seleção atuando severamente, especialmente, na população da RMSG. Houve grande variação no índice de fixação para os pequenos grupos de indivíduos analisados como subpopulações. Dados referentes às nove das onze subpopulações analisadas indicaram desvios nas proporções de genótipos observados em relação aos esperados sob condições de E.H.W., considerando os valores positivos ou negativos, maiores que 5%.

**Tabela 1**

Freqüências alélicas nos respectivos locos isoenzimáticos analisados nas onze subpopulações de plantas adultas de *Trema micrantha*.

(Allelic frequencies in the isoenzymatic locus in the eleven subpopulations of tree of *Trema micrantha*)

<b>Subpopulações</b>											
<b>Locos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>Mdh-1</b>											
(N)	16	10	13	15	11	30	7	15	8	14	37
a	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b	0,906	1,000	0,962	0,933	0,955	0,950	1,000	0,933	0,938	0,964	0,959
c	0,094	0,000	0,000	0,067	0,045	0,017	0,000	0,067	0,063	0,036	0,041
<b>Gdh-2</b>											
(N)	13	6	13	14	7	27	7	14	7	9	19
a	0,962	1,000	0,923	0,893	0,929	0,963	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500
b	0,038	0,000	0,077	0,107	0,071	0,037	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500
<b>Skdh</b>											
(N)	14	5	13	13	4	26	7	15	8	14	28
a	0,143	0,500	0,500	0,462	0,500	0,365	0,143	0,333	0,438	0,321	0,518
b	0,857	0,500	0,500	0,538	0,500	0,615	0,643	0,500	0,500	0,607	0,429
c	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,214	0,167	0,063	0,071	0,054
<b>Nadh</b>											
(N)	16	9	13	15	11	30	7	15	8	13	1
a	0,000	0,722	0,692	0,533	0,545	0,183	0,071	0,267	0,188	0,346	0,000
b	1,000	0,278	0,308	0,467	0,455	0,817	0,929	0,733	0,813	0,654	1,000
<b>Dia-2</b>											
(N)	16	9	12	15	11	29	7	14	8	12	22
a	0,344	0,611	0,458	0,367	0,318	0,276	0,357	0,357	0,313	0,375	0,386
b	0,375	0,278	0,500	0,333	0,227	0,638	0,429	0,429	0,313	0,458	0,432
c	0,281	0,111	0,042	0,300	0,455	0,086	0,214	0,214	0,375	0,167	0,182
<b>Mr</b>											
(N)	8	9	12	14	11	28	4	9	7	11	1
a	0,188	0,611	0,583	0,429	0,409	0,304	0,250	0,389	0,214	0,273	0,000
b	0,750	0,278	0,417	0,357	0,318	0,679	0,750	0,500	0,571	0,500	1,000
c	0,063	0,111	0,000	0,214	0,273	0,018	0,000	0,111	0,214	0,227	0,000
<b>Idh</b>											
(N)	16	8	12	15	11	29	7	15	8(N)	14	38
a	0,094	0,438	0,083	0,200	0,182	0,310	0,286	0,233	0,250	0,286	0,250
b	0,906	0,563	0,917	0,800	0,818	0,690	0,714	0,767	0,750	0,714	0,750
<b>Got</b>											
(N)	16	8	12	15	11	28	7	15	8	14	1
a	0,656	0,750	0,667	0,567	0,591	0,875	0,500	0,500	0,813	0,821	1,000
b	0,344	0,250	0,333	0,433	0,409	0,125	0,500	0,500	0,188	0,179	0,000

Subpopulações de 1 a 6 : Reserva Florestal de Santa Genebra

Subpopulações de 7 a 11 : Estação Ecológica dos Caetetus

N : Número de indivíduos analisados por subpopulação, nos respectivos locos

**Tabela 2**

Matriz de probabilidades, testando a hipótese de nulidade para distribuição semelhante das frequências alélicas nos 8 locos avaliados, de cada par comparativo de 11 subpopulações de *Trema micrantha*. (Matrix of probability for nullity hypothesis of similar distribution of the allelic frequencies in 8 locis available, combined for each pair of 11 subpopulations of *Trema micrantha*)

	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
1-1	-----										
1-2	0,0000	-----									
1-3	0,0001	0,6062	-----								
1-4	0,0015	0,3980	0,2770	-----							
1-5	0,0020	0,5445	0,0913	1,0000	-----						
1-6	0,0001	0,0002	0,0003	0,0000	0,0000	-----					
2-1	0,3558	0,0019	0,0003	0,0214	0,0670	0,0701	-----				
2-2	0,0328	0,0164	0,0017	0,2623	0,2480	0,0052	0,9919	-----			
2-3	0,1062	0,0759	0,0040	0,4533	0,6876	0,3059	0,6981	0,8339	-----		
2-4	0,0014	0,3474	0,0159	0,2659	0,4010	0,3158	0,3333	0,6409	0,9977	-----	
2-5	0,0032	0,3053	0,0074	0,3375	0,9394	0,0011	0,1302	0,5352	0,9994	0,6449	-----

1-1 População RMSG, subpopulação 1  
 1-2 População RMSG, subpopulação 2  
 1-3 População RMSG, subpopulação 3  
 1-4 População RMSG, subpopulação 4  
 1-5 População RMSG, subpopulação 5  
 1-6 População RMSG, subpopulação 6

2-1 População EEC, subpopulação 1  
 2-2 População EEC, subpopulação 2  
 2-3 População EEC, subpopulação 3  
 2-4 População EEC, subpopulação 4  
 2-5 População EEC, subpopulação 5

**Tabela 3**

Estimativas de parâmetros de diversidade genética intrapopulacional, para *Trema micrantha*, nos diferentes locais de estudo, obtidas por marcadores isoenzimáticos. (Estiation of parameters of intrapopulation genetic diversity for *Trema micrantha* in the differents studied place by isozymatic marker).

Espécies	Pop.	Subpop.	n	$\hat{A}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{f}$
Trema micrantha							
	R.M.S.G	1	16	2,12	0,278	0,290	0,041
		2	12	2,00	0,498	0,380	-0,339
		3	13	2,12	0,503	0,360	-0,423
		4	15	2,25	0,531	0,444	-0,205
		5	12	2,25	0,484	0,438	-0,104
		6	30	2,50	0,779	0,325	-0,164
		Média			2,20	0,446	0,373
	EEC	1	7	2,12	0,437	0,378	-0,176
		2	15	2,25	0,384	0,406	0,055
		3	8	2,25	0,366	0,388	0,059
		4	14	2,25	0,315	0,389	0,197
		5	38	2,20	0,345	0,337	-0,024
		Média			2,2	0,366	0,392
Média geral			14,5	2,211	0,411	0,376	-0,097

RMSG – Reserva Florestal de Santa Genebra  
 n - Número de indivíduos amostrados na subpopulação,  
 $\hat{H}_o$  - Heterozigosidade média observada  
 f - Coeficiente de endogamia,

EEC – Estação Ecológica dos Caetetus  
 $\hat{A}$  - Número de alelos por locos  
 $\hat{H}_e$  - Heterozigosidade média esperada

**Tabela 4**

Estimativas de parâmetros genéticos de 11 subpopulações em duas populações naturais *Trema micrantha* (N=178), empregando-se 8 locos isoenzimáticos, num total de 20 alelos.

(Estiation of genetic parameters of 11 subpopulations into two natural populations of *Trema micrantha* (N=178), using 8 isoenzymatic loci, adding 20 alleles).

Loco	$\hat{f}$	$\hat{F}$	$\hat{\theta}_{sp}$	$\hat{\theta}_p$
Mdh-1	0,186	0,173	-0,016	0,000
Gdh-2	0,175	0,192	0,021	0,051
Skdh	-0,360	-0,296	0,047	0,002
Nadhdh	0,063	0,272	0,222	-0,030
Dia	-0,041	-0,002	0,037	-0,004
Mr	-0,181	-0,102	0,068	0,000
ldh	-0,031	-0,021	0,010	-0,006
Got	-0,002	0,053	0,054	-0,019
Média	-0,090	-0,016	0,068	-0,007
I.C. (95%)	-0,201 a 0,026	-0,139 a 0,124	0,030 a 0,123	-0,016 a 0,002

$\hat{f}$  - Coeficiente médio de endogamia dentro das subpopulações       $\hat{F}$  - Coeficiente de endogamia total nas populações

$\hat{\theta}_p$  - Divergência genética entre populações

$\hat{\theta}_{sp}$  - Divergência genética entre subpopulações

Estimou-se o intervalo de confiança a 95% de probabilidade pelo método de reamostragem bootstrap, utilizando-se 1.000 repetições sobre locos.

A estimativa do índice de fixação médio para subpopulações foi pequena e negativa (-0,090). Considerando o intervalo de confiança, sugere-se que as subpopulações se apresentam sob panmixia. No entanto, variações deste parâmetro nos diferentes locos indicam o oposto. As estimativas para cinco dos oito locos analisados indicaram desvios de panmixia (estimativas positivas ou negativas maiores do que 5%) (Tabela 4).

O índice de fixação total médio nas populações foi negativo (-0,016), indicando pouca endogamia. No entanto, houve grande variação nas estimativas entre os locos analisados. A estimativa média do índice de fixação, que sugere uma única população panmítica, apresenta quatro locos indicando excesso de homocigotos e dois com deficiência destes genótipos. A estimativa média de divergência genética entre populações, que foi mínima (-0,007) não apresentou grandes variações entre os locos. Isto indica que a maior parte da diversidade genética encontra-se distribuída dentro das populações. Esse é um padrão de distribuição normalmente observado na maioria das espécies arbóreas, como é esperado em espécies alogamas ou de sistema misto de cruzamento, com predomínio de alogamia.

A estimativa da divergência genética entre subpopulações dentro de populações, também, foi baixa (0,068). No entanto, esta estimativa foi maior que a encontrada entre populações e

diferente de zero, sugerindo que a distribuição espacial agregada em clareiras, ou grupos de indivíduos, é importante para a manutenção da diversidade genética na espécie estudada. A baixa estimativa de diversidade genética entre subpopulações, dentro de populações, por outro lado, não se deve a um limitado fluxo gênico entre as mesmas. A espécie apresenta taxa de fluxo gênico aparente satisfatória para manter a diversidade genética baixa entre subpopulações dentro de populações ( $N_m$  de 2,294).

## DISCUSSÃO

*T. micrantha* é comum nas faixas de vegetação ao longo dos cursos d'água, em capoeirões, pastos mal conservados e, até mesmo, nos terrenos baldios nos centros urbanos. Esta espécie, devido à sua grande plasticidade, adapta-se aos diferentes tipos de ambientes, sendo muito utilizada em projetos de revegetação e agrossilvicultura (Carvalho, 1994; Kageyama et al., 2001). Diante da eficiente capacidade de colonização, torna-se justificável o padrão de diversidade genética verificado para esta espécie. A diversidade estimada foi alta quando comparada à média das oito espécies do estágio inicial de sucessão levantadas por Hamrick et al. (1992), bem como para as espécies dos estágios intermediário e avançado ( $\hat{H}_e = 0,137; 0,171$  e  $0,182$ , respectivamente). Da mesma forma, a estimativa foi superior às médias

para espécies arbóreas de vida curta (0,111), para as populações de espécies arbóreas de vida longa e que dependem do vento para a polinização (0,154) ou que dependem de animais para dispersar suas sementes (0,149).

A taxa de heterozigosidade observada na população da RMSG superior à esperada sob as condições de E.H.W. Isto sugere que a espécie está bem adaptada aos ambientes alterados. A elevada heterozigosidade e o coeficiente de endogamia intrapopulacional negativo observados, indicam a habilidade da espécie em manter alta diversidade genética em condição de natureza antropizada. Sua ocorrência, sobretudo, depende de agentes dispersores de sementes e do fluxo gênico dentro e entre populações, sob as mais diferentes condições. Esta espécie sistema de polinização dependente de ventos mas conta com animais para dispersar suas sementes por médias e longas distâncias, especialmente aves e primatas que são atraídos pelos frutos maduros.

Os resultados encontrados nesse estudo indicam eficiente fluxo gênico entre populações e dentro das mesmas, sendo o suficiente para manter alta diversidade genética na espécie e estreita relação genética, mesmo entre populações mais distantes. As estimativas indicaram desvios em relação à panmixia e que a estruturação espacial de forma agregada é favorável para a manutenção da diversidade genética nesta espécie.

A estimativa da divergência genética maior entre subpopulações do que entre populações sugere que a dispersão de pólen pelo vento ocorre de forma restrita aos pequenos grupos dentro de clareiras. Mesmo existindo esta tendência de estruturação genética espacial nas respectivas subpopulações, a divergência entre clareiras próximas sugere um processo de seleção microambiental com favorecimento de múltiplos genótipos atuando dentro de cada clareira.

Acredita-se que *T. micrantha* pode se manter, sem prejuízos genéticos em curto prazo, sob condições de paisagem antropizada. Na RMSG, que apresenta vegetação alterada, existe diferença significativa entre as estimativas de heterozigosidade observada e esperada, ( $\hat{H}_e$  de 0,446 e  $\hat{H}_e$  de 0,373), indicando excesso de heterozigotos. Da mesma forma, a diferença entre as estimativas de heterozigosidade observada, comparativamente entre os dois fragmentos ( $\hat{H}_e$  de 0,446 e 0,366), também revelou maior frequência de heterozigotos nas populações amostradas no fragmento mais alterado. Porém, não se observou a mesma magnitude nas diferenças verificadas entre as es-

timativas de heterozigosidade esperada sob condições de E.H.W. ( $\hat{H}_e$  de 0,373 e 0,392). Assim, pode-se dizer que um processo de seleção em favor dos heterozigotos está atuando nas populações estudadas, especialmente na população localizada na RMSG. As maiores proporções de heterozigotos mantidas nas subpopulações podem ser devido à condição de alta competição dentro das clareiras. Resultados sob o mesmo foco de discussão foram encontrados por Epperson e Alvarez-Buylla (1997). Esses autores estudaram populações de *Cecropia obtusifolia*, comparativamente, entre diferentes estágios de vida, e evidenciaram seleção microambiental pelo favorecimento de múltiplos genótipos dentro de uma dada clareira, além de, também, terem verificado menores estimativas para divergência genética entre populações mais distantes entre si.

*T. micrantha* é mais facilmente encontrada em florestas secundárias e ao longo de paisagens fragmentadas do que dentro das florestas primárias. Essa possibilidade de adaptação às condições de fragmentação está, provavelmente, associada à eficiência do fluxo gênico e, diretamente dependente da existência de agentes dispersores. A estimativa de fluxo gênico dentro das populações da espécie estudada foi menor do que entre populações. Provavelmente, isso está associado às características da ação de dispersão dos grãos de pólen pelo vento. O fluxo gênico via pólen não é muito eficiente, ficando mais restrito às clareiras. No entanto, estudos de espécies anemófilas demonstraram que grãos de pólen podem percorrer grandes distâncias. Por exemplo, em uma espécie de *Pinus*, constatou-se uma distância de dispersão de até 500 m, garantindo grande frequência de migração entre populações (Hamrick, 1989). Quanto à dispersão de sementes, Alvarez-Buylla e Martínez-Ramos (1990) verificaram que a maioria das sementes de *C. obtusifolia*, dispersas por pássaros e morcegos caíam a poucos metros da planta mãe mas, também, foram encontradas sementes distantes 500 m da mesma.

Como já verificado em alguns estudos, até mesmo as árvores remanescentes nos pastos podem exercer considerável influência no nível de fluxo gênico entre populações fragmentadas (Chase et al., 1996; Aldrich e Hamrick, 1998). Diante da maior frequência de indivíduos nas formações florestais secundárias, da posição de eficientes colonizadoras em áreas abandonadas, bordas de fragmentos e outras condições comuns em paisagens antropizadas, a alta diversidade genética verificada em *T. micrantha* pode ser mantida facilmente nas populações sob fragmentação.

## CONCLUSÕES

*Trema micrantha* apresenta alta diversidade genética em suas populações. O fluxo gênico entre as subpopulações, dispostas dentro de populações, e a disposição de indivíduos em clareiras são favoráveis para a manutenção da alta diversidade genética nesta espécie.

A espécie estudada pode se manter, sem prejuízos genéticos em curto prazo, sob condições de paisagens antropizada. Tal habilidade está, provavelmente, associada a uma alta competição dentro das clareiras, resultando em um processo de seleção em favor da manutenção de maiores proporções de heterozigotos.

## AUTORES E AGRADECIMENTOS

LUCIANO ARRUDA RIBAS é Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP – E-mail: laribas@esalq.usp.br

PAULO YOSHIO KAGEYAMA é Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP - Av. Pádua Dias, 11 – Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13.400-970 – E-mail: kageyama@esalq.usp.br

Os autores agradecem à FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto de pesquisa (Projeto: 00/00815-4). Agradecem à Fundação José Pedro de Oliveira e ao Instituto Florestal pelo acesso às populações de ambas espécies estudadas, na Reserva de Santa Genebra e na Estação Ecológica dos Caetetus, respectivamente. Finalmente, agradecem a colaboração dos técnicos Gelson, Andréia e Elza, além de outros que, de alguma forma, participaram do desenvolvimento deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical mosaic. **Science**, v.281, p.103-105, 1998.
- ALFENAS, A.C.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J.R.; ALONSO, S.K.; SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p.85-114
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.

ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; GARAY, A.A. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer species. **Evolution**, v.48, n.2, p.437-453, 1994.

ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; MARTÍNEZ-RAMOS, M. Seed bank versus seed rain in the regeneration of a tropical pioneer tree. **Oecologia**, v.84, p.314-325, 1990.

BAWA, K.S.; BULLOCK, S.H.; PERRY, D.R.; COVILLE, R.E.; GRYUM, M.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees: 2- pollination systems. **American journal of botany**, v.72, p.346-356, 1985a.

BAZZAZ, F.A. Regeneration of tropical forests: physiological responses of pioneer and secondary species. In: GÓMEZ-POMPA, A.; WHITMORE, T.C.; HADLEY, M. **Rain forest regeneration and management**. Paris: UNESCO, 1991. p.91-118 (Man and the biosphere series, 6)

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

BUDOWSKI, G. Distribution of tropical American rain forest species in the light of successional processes. **Turrialba**, v.15, n.1, p.40-42, 1965.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA / CNPF, 1994. 640p.

CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, n.383, p.398-399, 1996.

EPPELSON, B.K.; ALVAREZ-BUYLLA, E.R. Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. **Evolution**, v.51, n.1, p.275-282, 1997.

HAMRICK, J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. (Ed.). **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. p.87-105

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAN-BROYLES, S.L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New forests**, v.6, p.95-124, 1992.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Genetic structure of tropical populations: associations with reproductive biology. In: BROCK, J.H.; LINHART, Y.B. (Ed.). **The evolutionary ecology of plants**. Boulder: Westview Press, 1989. p.215-248

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro, 1993.

- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; OLIVEIRA, R.E.O.; MORAES, L.F.D. **Restauração de mata ciliar: manual de recuperação de áreas ciliares e microbacias**. Rio de Janeiro: Semads, 2001. 104p.
- LEITÃO-FILHO, H.F. A vegetação. In: LEITÃO-FILHO, H.F.; MORELLATO, L.P. (Ed.). **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. p.19-29
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data: version 1.0**. Disponível em: <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/2000>>. Acesso em: 16 jun. 2003
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 360p.
- LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. **New forests**, v.6, p.67-94, 1992.
- MILLER, M.P. **Tools for population genetics analyses (TFPGA) 1.3: a windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data**. (Software) Distributed by author, 1997.
- MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. **Trends in ecology and evolution**, v.10, p.58-62, 1995.
- PERECIN, M.B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss**. Piracicaba, 2000. 134p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2001. 328p.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v.49, p.1280-1283, 1995.
- RIBAS, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. Sistemas isoenzimáticos para o estudo da estrutura genética de populações de *Trema micrantha* e *Cecropia pachstachya*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47, Águas de Lindóia, 2001. **Anais**. Águas de Lindóia, 2001.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v.236, p.787-792, 1987.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual review of ecology and systematics**, v.16, p.393-430, 1985.
- TORRES, R.B. **Biologia da reprodução de *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae)**. Campinas, 1996. 140p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer, 1996. 377p.
- WHITMORE, T.C. Tropical rain forest dynamics and its implications for management. In: GÓMEZ-POMPA, A.; WHITMORE, T.C.; HADLEY, M. (Ed.). **Rain forest regeneration and management**. Paris: UNESCO, 1991. p.67-90 (Man and the biosphere series, 6)
- YOUNG, A.G.; BOYLE, T.J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics: principles and practice**. Oxford: CSIRO, 2001. p.123-134