

Sistema de cruzamento de *Trema micrantha* (L.)B. em fragmentos florestaisMating system of *Trema micrantha* (L.)B. in forest fragmentsLuciano Arruda Ribas¹ e Paulo Yoshio Kageyama²**Resumo**

A utilização dos princípios genéticos no manejo e conservação de espécies da floresta tropical requer detalhado conhecimento do modo de reprodução, sistema de cruzamento e estrutura genética nas populações das espécies de interesse. *Trema micrantha* é espécie pioneira típica, polinizada pelo vento e produz muitas sementes que são dispersas por animais. Seu sistema de cruzamento foi avaliado com base em 24 progênies com 10 indivíduos, obtidas de populações localizadas em dois fragmentos no Estado de São Paulo. Os parâmetros foram estimados a partir de 13 locos isoenzimáticos polimórficos, somando-se 30 alelos. *T. micrantha* apresenta sistema de cruzamento misto, com preferência por alogamia (\hat{f}_m de 0,966 e 0,819), e suas populações estão sujeitas a variações nas proporções de endogamia (\hat{F} de -0,022 e 0,103) e a altas taxas de cruzamentos biparentais (\hat{f}_p de 0,653 e 0,605). Verificou-se significativa proporção de cruzamentos entre indivíduos aparentados ($\hat{f}_m - \hat{f}_s$ de 0,106 e 0,151), indicando estruturação espacial dos indivíduos sob condições naturais da espécie. A espécie tende a manter maior endogamia em suas populações e apresentar maiores proporções de cruzamentos correlacionados.

Palavras-chave: Espécie pioneira, Isoenzima, Sistema de cruzamento

Abstract

The utilization of genetics in the management and conservation of tropical forest species requires detailed knowledge of the mating system and genetic structure in populations of the species of interest. *Trema micrantha* is one of the first species to establish in abandoned areas and is wind pollinated and produces seeds that are dispersed by animals. The mating system of this species was evaluated in two fragments of a deciduous tropical forest in the State of São Paulo. Ten seeds per plant and 24 plants per population were germinated to generate progeny arrays used in the analyses. The mating system parameters were estimated from 13 polymorphic isozyme loci with 30 alleles. The results indicated: in a mixed mating system *T. micrantha*, with preferential outcrossing ($\hat{f}_m = 0.966$ and 0.819 , in both fragments); 2) variation in inbreeding frequency ($\hat{F} = -0.022$ and -0.103 , in both fragments); and 3) high rates of biparental mating ($\hat{f}_p = 0.653$ and 0.605). A significant proportion of related individuals were observed ($\hat{f}_m - \hat{f}_s = 0.106$ and 0.151 , both fragments), indicating a spatial structure of individuals under the species natural condition.

Keywords: Isozyme, Mating systems, Pioneer tree

INTRODUÇÃO

As florestas tropicais possuem grande diversidade de espécies arbóreas com diferentes sistemas reprodutivos associados às complexas interações com agentes polinizadores e dispersores de sementes. Para a maioria destas espécies arbóreas, pode-se considerar que ocorrem em baixas densidades, dependendo de animais para a dispersão de pólen e/ou sementes e se reproduzem por fecundação cruzada, sendo predominantemente alógamas (BAWA, 1974).

Para o manejo e a conservação de espécies arbóreas, é fundamental considerar o modo de reprodução, o sistema de cruzamento e a estrutura genética nas populações das espécies de interesse. A ocorrência de endogamia, por exemplo, não de-

pende apenas das características genéticas do indivíduo, mas, também, da configuração espacial dos seus aparentados (BAWA e KRUGMAN, 1991).

O sistema de cruzamento é fundamental na determinação da composição genética das populações. Ele regula a distribuição da diversidade genética entre e dentro de progênies, populações e subdivisões de uma população (HAMRICK, 1982). Assim, o sistema de cruzamento determina a associação entre as progênies e o grau de parentesco entre os descendentes que compõem tais progênies, bem como afeta a heterogeneidade genética espacial dentro e entre populações naturais. Ele é determinado pela taxa de autofecundação, cruzamentos correlacionados, padrão de distribuição de indivíduos parentes (estrutura de família) e pelas características do fluxo gênico

¹Pesquisador da Embrapa Acre - Caixa Postal 321 - Rio Branco, AC - 69908-970 - E-mail: laribas@cpafac.embrapa.br

²Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13400-970 - E-mail: kageyama@esalq.usp.br

da espécie. O florescimento das plantas e a movimentação dos grãos de pólen e sementes entre e dentro das populações caracteriza o fluxo gênico. O fluxo gênico restrito define a variação das populações em resposta à seleção natural local ou à deriva genética, enquanto que fluxo gênico por longas distâncias promove a homogeneidade genética entre as populações da espécie (SLATKIN, 1985; ELLSTRAND, 1992).

Uma das principais mudanças causadas pelo homem no meio ambiente é a fragmentação e a degradação de florestas contínuas (SAUNDERS *et al.*, 1991). As drásticas mudanças na geometria da paisagem tendem a afetar as interações entre plantas e animais e, conseqüentemente, a demografia e o recrutamento de plantas (JANZEN, 1980; HOWE, 1984). A fragmentação pode afetar a densidade populacional de animais, a amplitude de flutuação das suas populações, as atividades dos polinizadores e o arranjo de forrageamento dos mesmos (SHAFFER, 1981; PULLIAM, 1988), atingindo, potencialmente, a polinização e o nível de produção de sementes nas plantas (JENNERSTEN, 1988; MENGES, 1991). Da mesma forma, a reprodução das plantas pode ser afetada pelas mudanças no microclima, em resposta às alterações do vento, da insolação e da dessecação (SAUNDERS *et al.*, 1991). Assim, as conseqüências genéticas da fragmentação causam alterações no fluxo gênico original, refletindo diretamente na taxa de cruzamento por alterar o tamanho das populações das espécies, ou indiretamente, por influenciar a abundância ou o comportamento dos agentes polinizadores (KARRON *et al.*, 1995). Portanto, tais conseqüências tendem a aumentar a freqüência de cruzamentos endogâmicos nas populações remanescentes. O aumento da endogamia ou homoziguidade pode resultar em depressão endogâmica, sendo esta mais severa em espécies predominantemente alógamas que mantêm altos níveis de carga genética (NASON e HAMRICK, 1997).

Para as espécies pioneiras ou populações de plantas colonizadoras, a possibilidade de reprodução pode ser vista como um desafio durante o processo de ocupação de novas áreas (BAKER, 1955). Nesse aspecto, associado à ocorrência de gargalo genético (bottleneck) variando com o tamanho da população colonizadora, o sistema de cruzamento apresenta papel fundamental na sobrevivência das novas populações. Ele afeta profundamente a diversidade genética e a estrutura das populações colonizadoras. Isso está associado à capacidade de resposta à pressão seletiva local (HAMRICK *et al.*, 1979).

Bawa (1974) afirma que, entre as espécies colonizadoras, predomina a fecundação cruzada. Além disso, praticamente todas elas são auto-compatíveis (BROWN e MARSHALL, 1981).

Segundo Murawski *et al.* (1994), a ocorrência de espécies arbóreas em grupos na floresta é atípica e isto poderia aumentar os níveis de endogamia devido aos cruzamentos entre aparentados e biparentais, se os indivíduos dentro do grupo forem parentes e a dispersão genética for limitada. No entanto, seus estudos não confirmaram o esperado, e foram justificados pela longa distância de dispersão de pólen e de sementes e, talvez, pela exclusão das progênies endogâmicas devido à competição. No mesmo trabalho, esses autores determinaram também, que as taxas de endogamia, resultantes de autofecundação e de cruzamentos entre aparentados, foram maiores nas florestas perturbadas. No entanto, baseados em avaliações qualitativas, eles verificaram que tais árvores sob condições de perturbação tiveram maior produção média de frutos e sementes.

Alguns estudos demonstram que as progênies das árvores componentes das populações amostradas nos contínuos florestais, são resultantes de maior número de doadores de pólen do que as progênies de árvores isoladas (CASCANTE *et al.*, 2002; MENGES, 1991; NASON e HAMRICK, 1997). Seus resultados revelam, também, o efeito negativo da fragmentação de habitats sobre a quantidade e o vigor das progênies geradas, o que é avaliado pela porcentagem e precocidade de germinação, e pela viabilidade das mudas.

De forma geral, o fluxo gênico é mais intenso em distâncias moderadas de 0,5 a 1 Km, mas, também, ocorre por distâncias de 2 a 3 Km (LEVIN e KERSTER, 1974). Hamrick (1982) definiu que, nas populações de espécies arbóreas tropicais, as árvores individuais recebem pólen de relativamente poucos doadores. Porém, a composição genética do pólen recebido varia grandemente entre árvores, e uma significativa proporção do pólen alcança relativamente longas distâncias.

Pesquisas genéticas têm revelado que os grãos de pólen e sementes de árvores tropicais podem atravessar grandes distâncias mesmo em terrenos fragmentados, sugerindo que árvores isoladas espacialmente podem formar ligações vitais entre populações (ALDRICH e HAMRICK, 1998).

Segundo Clegg (1980), uma forma eficiente de se estimar a taxa de cruzamento ou de autofecundação é analisar o sistema de cruzamento de

um conjunto de progênies por meio de marcadores genéticos. Esse conjunto de informações pode ser utilizado para elucidar as variações locais dos parâmetros do sistema de cruzamento, decorrentes de fatores ambientais e diferenças entre populações marginais e centrais, indicando mudanças microevolutivas seguindo o "efeito fundador" (SUN e RITLAND, 1998). Da mesma forma, possibilita estudar os efeitos da fragmentação ou antropização, quando se comparam populações localizadas em florestas consideradas intactas com as fragmentadas.

Trema micrantha (Linnaeus) Blume é espécie arbórea pioneira que ocorre em vários tipos de ambientes (exceto nos mais úmidos), e possui toda a região que se estende entre as latitudes 30°N (Estados Unidos) e 30°S (Brasil), como área de ocorrência natural. No Brasil, ocorre em 19 Estados, além do Distrito Federal, tendo presença marcante tanto em Floresta Ombrófila Densa (Floresta Amazônica e Floresta Atlântica) quanto nos Campos rupestres ou de altitude (CARVALHO, 1994). Como uma das primeiras espécies a se estabelecer em áreas abandonadas por agricultores (LORENZI, 1992), ou até mesmo em locais minerados de cassiterita e em áreas de dunas, sua ação pioneira é marcante também em ecossistemas não degradados, tendo sido verificada a média de 25.000 indivíduos regenerantes por hectare, devido à ativação do banco de sementes, em Ilha Solteira, SP (KAGEYAMA, 1992).

A espécie é classificada como hermafrodita críptica por possuir plantas variando de monóicas a dióicas (TORRES, 1996). Suas flores são unissexuais ou bissexuais andrógenas, sendo polinizadas principalmente pelo vento, mas, também, visitadas por pequenos insetos (BAWA *et al.*, 1985). Devido à grande quantidade de frutos produzidos, a espécie destaca-se na alimentação da fauna, sendo suas sementes dispersas por aves, primatas e outros animais (CARVALHO, 1994). Apresentando crescimento rápido, chega a 6 m de altura em 14 meses (FERREIRA *et al.*, 1977) em regeneração natural e artificial, *Trema micrantha* é recomendada para reposição de mata ciliar em locais sem inundação, para conservação de solos, recuperação de áreas erodidas e de mineração e estabilização de dunas.

Diante de toda essa exposta versatilidade ecológica, o objetivo deste estudo foi estimar os parâmetros do sistema de cruzamento da espécie pioneira arbórea *Trema micrantha*, a partir das frequências gênicas e genotípicas de progênies amostradas de duas populações, obtidas por

eletroforese de isoenzimas, e avaliar os efeitos da fragmentação sobre os cruzamentos nas populações remanescentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Progênies foram amostradas de populações de *Trema micrantha* (L.) B.. As populações estudadas foram amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus (EEC) e na Reserva Municipal de Santa Genebra (RMSG). A EEC está situada entre a latitude 22° 22' a 22° 27' S e longitude 49° 40' e 49° 43' W, entre os municípios de Gália e Alvilândia, SP. Ela compreende uma área de 2.179 ha de floresta tropical latifoliada semidecídua, com características primárias. Nela, encontram-se árvores com altura de até 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. A EEC está inserida em uma paisagem de intensa exploração agrícola (principalmente café e laranja) e pecuária.

A RMSG contém 251,8 ha de floresta tropical estacional semidecídua (IBGE, 1993) e está localizada nas coordenadas 22° 49' 45" S e 47° 06' 33" W, no Município de Campinas, SP. Ao longo de sua área levemente ondulada, com altitudes variando de 580 a 610 m, verifica-se um mosaico de vegetação, em que várias fases sucessionais são encontradas. Ocorrem tanto áreas com floresta preservada, formando um dossel contínuo de 15 a 25 m de altura, como também áreas muito perturbadas, ocupadas por espécies em estágio sucessional inicial. Inserida numa paisagem urbanizada, neste fragmento, além dos processos naturais e os efeitos de borda, ocorreram perturbações antrópicas como queimada, extração seletiva de madeira e corte raso de pequenos trechos para extração da lenha (LEITÃO-FILHO, 1995).

Para coleta das sementes, realizaram-se visitas a campo ao longo dos meses de janeiro a junho de 2001, para ensacamento de ramos, visando garantir a permanência de frutos maduros nas plantas. As coletas foram realizadas individualmente por árvore e o material foi levado ao laboratório. As sementes foram mantidas em ácido sulfúrico concentrado por 20 minutos e lavadas em água corrente por outros 10 (TORRES, 1996). Posteriormente, foram novamente lavadas com hipoclorito de sódio comercial a 0,2%, antes de seguir para as caixas de germinação (gerbox).

As sementes foram submetidas ao fotoperíodo de 8 h de escuro e 16 h de luz, à temperatura alternada de 30°C sob luz e 20°C no escuro. Obteve-se alta taxa de germinação (> 85%), mas com grande variação entre as progênies. As plântulas foram repicadas e aclimatadas no laboratório, até serem transferidas para a casa de vegetação, para produção das folhas para a análise enzimática.

Somaram-se 24 progênies, sendo 10 plântulas de cada progênie para as análises. Das progênies, nove foram coletadas da população da RMSG e as demais, da EEC.

Previamente à aplicação da técnica de eletroforese de isoenzimas, testaram-se quatro sistemas tampão gel/eletrodo com 32 sistemas enzimáticos. Durante a extração, utilizou-se a solução tampão de extração 1, citada por Alfenas *et al.*, (1991). Os procedimentos posteriores seguiram as recomendações descritas pelos mesmos autores. Feita a seleção, as enzimas extraídas das folhas jovens de *T. micrantha* foram submetidas à eletroforese e à revelação para glutamato desidrogenase (GLUDH, E.C. 1.1.1.47), xiquimato desidrogenase (SKDH, E.C. 1.1.1.25), fosfatase ácida (ACP, E.C. 3.1.3.2), isocitrato desidrogenase (IDH, E.C. 1.1.1.42), malato desidrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37), diaforase (DIA, E.C. 1.8.1.4), glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT, E.C. 2.6.1.1), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, E.C. 1.1.1.49) e esterase (EST, E.C. 3.1.1.1). Desse processo, obtiveram-se os zimogramas dos quais foram interpretados 13 locos polimórficos, somando 30 alelos.

Durante a eletroforese, as enzimas GDH, SKDH, ACP, IDH e MDH apresentaram melhor padrão de revelação e resolução, sob o sistema tampão gel/eletrodo desenvolvido por Clayton e Tretiak (1972), que é descrito com algumas modificações (Sistema 8) em Alfenas *et al.* (1991). Para as demais enzimas, optou-se pelo sistema tampão gel/eletrodo desenvolvido por Hakim-Elahi (1980), citado por Alfenas *et al.* (1991) (sistema 25).

Para inferir sobre o sistema de cruzamento, com base nas frequências genotípicas obtidas da análise isoenzimática, utilizou-se o programa MLTR (*Multilocus Mating System Program*, versão 1.1, revisado em novembro de 1996) desenvolvido por Ritland (1994). O programa permite estimar a taxa de fecundação cruzada (t_m e t_s); o coeficiente de endogamia de Wright (F); avaliar cruzamentos correlacionados (r_t e r_p). O programa informa também sobre as frequências alélicas no conjunto de pólen (p) e nos óvulos (o) e determina os genótipos maternos.

O modelo de cruzamento misto assume que as plântulas resultam de uma mistura de cruza-

mentos aleatórios e autofecundações, sendo considerado que: 1) o conjunto de pólen é distribuído de forma homogênea para cruzamento com todos os genótipos maternos; 2) os alelos de diferentes locos segregam independentemente; 3) os locos não são afetados pela seleção ou mutação no período desde o cruzamento até a análise; 4) e os locos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ou que a segregação dos alelos em plantas maternas heterozigotas é estritamente mendeliana, em uma razão de 1:1, tanto para produção de pólen como de óvulo (RITLAND e JAIN, 1981). Para se testar a hipótese de que as populações estão em EHW, compararam-se as frequências genotípicas observadas em relação às frequências genotípicas esperadas segundo o modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, avaliando se os desvios existentes são ou não significativamente diferentes de zero. Para tanto, utilizou-se o teste Exato de Fisher. A análise foi desenvolvida com auxílio do programa TFP-GA disponibilizado por Miller (1997), quando foram utilizadas dez baterias de análises, com 1.000 permutações cada, num total de 10.000 permutações. Também se aplicou o teste qui-quadrado para testar a homogeneidade (independência) das frequências alélicas de pólen e óvulos sobre as populações da espécie e respectivas populações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados encontrados no teste Exato de Fisher, quanto aos desvios das frequências genotípicas observadas das esperadas pelo modelo de EHW, verificou-se que poucos locos não apresentaram distribuição aleatória das frequências gênicas. Apenas os locos Skdh, Idh, Mdh-2 e Mdh-1, na população amostrada na RMSG, e os locos Skdh, Acp-2 e Est, da população da EEC não apresentaram distribuições esperadas segundo as proporções de EHW ao nível de significância de 5% (Tabela 1).

Desvios do EHW podem ser causados pelo sistema de reprodução ou por fatores evolutivos como seleção, migração, mutação e deriva genética, agindo de forma isolada ou em conjunto (RITLAND e JAIN, 1981). Para se separar os efeitos reprodutivos dos fatores evolutivos, seria necessário aplicar o teste de equilíbrio de endogamia de Wright (EEW). No entanto, este teste só é realizado em locos que apresentam mais de três alelos. Portanto, como apenas o loco Skdh permitiria a aplicação do teste, este foi inviabilizado.

De acordo com os resultados do teste de homogeneidade das frequências alélicas dos óvu-

los e pólen para ambas populações (Tabela 2), 50% dos locos apresentaram homogeneidade nas frequências alélicas. Os locos Skdh, Idh, Est, Mdh-1, Dia-2 e Got indicaram distribuição homogênea das frequências alélicas apenas na população de EEC, enquanto o loco Acp-3 teve este comportamento na população da RMSG.

Diferenças nas frequências gênicas do pólen e do óvulo indicaram desvios de cruzamentos aleatórios, sendo que a causa pode estar associada a diferentes fatores. Para a espécie em questão, as diferenças nas funções masculinas e femininas das plantas e a amostragem não representativa das plantas maternas são justificativas plausíveis. A floração ocorre distribuída por um longo período, o que propicia condições para que determinadas árvores troquem gametas entre si, enquanto que outras se encontram em fases distintas de desenvolvimento como plena frutificação, maturidade das suas flores, ou mesmo, sem reprodução no ano em questão. Além disso, a maioria das flores de *T. micrantha* é monossuada. Isso aumenta as chances de que as árvores amostradas não estejam no conjunto de pólen e óvulos representantes das populações compostas por grande número de indivíduos.

Tabela 1. Probabilidades obtidas nos testes de aderência às proporções de Hardy-Weinberg, para os locos polimórficos analisados nas progênies de *Trema micrantha*, de duas populações, utilizando-se o teste Exato de Fisher. (Exact probabilities of Hardy-Weinberg equilibrium in *Trema micrantha* progenies, sampled in two populations)

Locos	Populações	
	RMSG	EEC
Gludh	0,247	-----
Skdh	0,004**	0,000**
Acp-3	0,249	0,252
Acp-2	0,231	0,016*
Acp-1	0,464	0,228
Idh	0,014*	0,076
Est	0,567	0,000**
Mdh-2	0,019*	1,000
Mdh-3	-----	1,000
Mdh-1	0,042*	0,286
Dia-2	0,433	0,453
Got	0,110	0,175
G6pdh	1,000	0,153

RMSG: Reserva Florestal de Santa Genebra

EEC: Estação Ecológica dos Caetetus

----- Não testado

*Frequências gênicas não apresentaram distribuição ao acaso, segundo as proporções de EHW, pelo teste Exato de Fisher, ao nível de significância de 5%

**Frequências gênicas não apresentaram distribuição ao acaso, segundo as proporções de EHW, pelo teste Exato de Fisher, ao nível de significância de 1%

Tabela 2. Divergência genética entre frequências alélicas dos óvulos e pólen em duas populações de *Trema micrantha* e probabilidades pelo teste qui-quadrado. (Allele frequencies divergence between ovule and pollen pool, in two *Trema micrantha* populations, and Chi-square probabilities)

Loco	Alelo	Populações					
		RMSG			EEC		
		Pólen	Óvulo	P	Pólen	Óvulo	P
Gdh	1	0,922 (0,038)	0,889 (0,063)	0,425	0,993 (0,000)	0,968 (0,000)	0,201
	2	0,078 (0,038)	0,111 (0,063)		0,007 (0,000)	0,032 (0,000)	
Skdh	1	0,900 (0,096)	0,722 (0,067)	0,001**	0,511 (0,076)	0,452 (0,085)	0,217
	2	0,100 (0,096)	0,278 (0,067)		0,415 (0,075)	0,516 (0,085)	
	3	----	----		0,073 (0,025)	0,032 (0,000)	
Acp-3	1	0,094 (0,030)	0,056 (0,023)	0,461	0,053 (0,023)	0,100 (0,043)	0,000**
	2	0,631 (0,133)	0,611 (0,065)		0,531 (0,056)	0,800 (0,053)	
	3	0,275 (0,138)	0,333 (0,067)		0,416 (0,051)	0,100 (0,045)	
Acp-2	1	0,666 (0,204)	0,500 (0,000)	0,017*	0,159 (0,035)	0,533 (0,063)	0,000**
	2	0,334 (0,204)	0,500 (0,000)		0,841 (0,035)	0,467 (0,063)	
Acp-1	1	0,094 (0,047)	0,222 (0,151)	0,013*	0,398 (0,095)	0,167 (0,083)	0,000**
	2	0,906 (0,047)	0,778 (0,151)		0,602 (0,095)	0,833 (0,083)	
Idh	1	0,100 (0,045)	0,222 (0,058)	0,019*	0,271 (0,045)	0,200 (0,059)	0,237
	2	0,900 (0,045)	0,778 (0,058)		0,729 (0,045)	0,800 (0,059)	
Est	1	0,834 (0,145)	0,500 (0,028)	0,000**	0,767 (0,053)	0,767 (0,066)	1,000
	2	0,166 (0,145)	0,500 (0,028)		0,233 (0,053)	0,233 (0,066)	
Mdh-2	1	0,840 (0,056)	0,778 (0,072)	0,191	0,985 (0,008)	0,967 (0,022)	0,406
	2	0,084 (0,030)	0,167 (0,069)		0,015 (0,008)	0,033 (0,022)	
	3	0,077 (0,031)	0,056 (0,061)		----	----	
Mdh-3	1	0,077 (0,039)	0,053 (0,003)	0,491	0,007 (0,004)	0,032 (0,000)	0,201
	2	0,923 (0,039)	0,947 (0,003)		0,993 (0,004)	0,968 (0,000)	
Mdh-1	1	0,250 (0,086)	0,444 (0,136)	0,004**	0,172 (0,060)	0,167 (0,080)	0,929
	2	0,750 (0,086)	0,556 (0,136)		0,828 (0,060)	0,833 (0,080)	
Dia-2	1	0,133 (0,184)	0,316 (0,089)	0,000**	0,177 (0,073)	0,167 (0,075)	0,980
	2	0,534 (0,224)	0,632 (0,090)		0,792 (0,073)	0,800 (0,092)	
	3	0,332 (0,149)	0,053 (0,003)		0,031 (0,017)	0,033 (0,027)	
Got	1	0,250 (0,107)	0,056 (0,048)	0,000**	0,061 (0,042)	0,133 (0,052)	0,076
	2	0,562 (0,173)	0,556 (0,099)		0,402 (0,066)	0,467 (0,124)	
	3	0,188 (0,158)	0,380 (0,066)		0,537 (0,049)	0,400 (0,107)	
G6pdh	1	0,167 (0,064)	0,500 (0,021)	0,000**	0,186 (0,062)	0,367 (0,093)	0,004**
	2	0,833 (0,064)	0,500 (0,021)		0,814 (0,062)	0,633 (0,093)	

RMSG: Reserva Florestal de Santa Genebra; EEC: Estação Ecológica dos Caetetus; -----: Não testado; **Diferença significativa entre as frequências alélicas a 95% de probabilidade; *Diferença significativa entre as frequências alélicas a 99% de probabilidade.

A amostra de 24 progênies e 13 locos polimórficos é satisfatória na obtenção das estimativas dos parâmetros do sistema de cruzamento, reduzindo os possíveis efeitos da violação da pressuposição de homogeneidade das frequências alélicas dos óvulos e do pólen sobre tais estimativas (RITLAND e JAIN, 1981).

A população amostrada na EEC apresentou distribuição de alelos mais homogênea do que na RMSG, refletindo os efeitos da fragmentação de contínuos florestais sobre a população da espécie. Por outro lado, a maior proporção de locos com distribuição homogênea de pólen na RMSG pode estar refletindo a entrada de grãos de pólen de indivíduos localizados próximos à população estudada. Este fragmento encontra-se em uma paisagem que permite alta eficiência do vento no transporte de pólen por grandes distâncias.

As estimativas dos parâmetros do sistema de cruzamento (Tabela 3) revelam elevadas taxas de fecundação cruzada multilocos e, com base no desvio padrão, diferença significativa entre as duas populações (0,819 e 0,966 para RMSG e EEC, respectivamente). Baseado nisso, pode-se considerar que *T. micrantha* apresenta sistema de cruzamento misto, com predomínio de fecundação cruzada. O índice de fixação estimado para a população da RMSG foi positivo e elevado, podendo indicar endogamia nesta população (\hat{F} de 0,103 e -0,022). No entanto, o desvio padrão a partir de 1.000 reamostragens (bootstrapping) sobre progênies indicou grande variação nas estimativas. As diferenças entre as taxas de cruzamento multilocos e unilocos foram positivas e significativas ($\hat{f}_m - \hat{f}_s$ de 0,106 e 0,151), sugerindo que ocorrem cruzamentos entre aparentados e que as populações estão estruturadas espacialmente.

Tabela 3. Estimativa de taxa de cruzamento unilocus (\hat{f}_s), multilocos (\hat{f}_m), entre aparentados ($\hat{f}_m - \hat{f}_s$), correlação de cruzamentos (\hat{r}_t), correlação de paternidade (\hat{r}_p) e coeficiente de endogamia (\hat{F}) para as populações de *Trema micrantha*, a partir de marcadores isoenzimáticos. (Mating system estimations in two populations of *Trema micrantha*. Single-locus outcrossing rate (\hat{f}_s), Multi-locus outcrossing rate (\hat{f}_m), biparental inbreeding ($\hat{f}_m - \hat{f}_s$), outcrossing correlation (\hat{r}_t), paternity correlation (\hat{r}_p), and fixation index (\hat{F}) estimated with isoenzymes).

Parâmetros	Populações	
	RMSG	EEC
\hat{F}	0,103 (0,104)	-0,022 (0,096)
\hat{f}_m	0,819 (0,095)	0,966 (0,027)
\hat{f}_s	0,713 (0,085)	0,815 (0,048)
$\hat{f}_m - \hat{f}_s$	0,106 (0,029)	0,151 (0,036)
\hat{r}_t	0,418 (0,274)	-0,100 (0,463)
\hat{r}_p	0,605 (0,146)	0,653 (0,137)

() Erro padrão médio obtido pelo método de reamostragem (bootstrap), utilizando-se 1.000 repetições sobre progênies; RMSG: Reserva Florestal de Santa Genebra; EEC: Estação Ecológica dos Caetetus.

As estimativas de cruzamentos correlacionados entre pares de sementes foram contrastantes entre as populações, sendo significativamente diferente de zero na população da RMSG (\hat{r}_t de 0,418 e -0,100 para RMSG e EEC, respectivamente). Ambas as populações apresentaram estimativas elevadas para correlação entre grãos de pólen (\hat{r}_p de 0,605 e 0,653 para RMSG e EEC, respectivamente), indicando que a maior parte dos indivíduos nas progênies de fecundação cruzada são irmãos completos.

Taxas de fecundação cruzada foram estimadas para cada progênie estudada (Tabela 4) e revelaram grande variação entre árvores, com \hat{f}_m variando de 0,20 a 1,48, na mesma população. Salienta-se que os valores 0,00 e 2,00 indicam não convergência dos dados ao modelo de cruzamento misto.

Tabela 4. Estimativas de taxa de fecundação cruzada por progênie de *Trema micrantha* amostradas na Reserva Florestal de Santa Genebra (RMSG) e na Estação Ecológica dos Caetetus (EEC). (Outcrossing rate estimates of each *Trema micrantha* progeny, sampled in Santa Genebra Forest Reserve (RMSG) and Caetetus Ecological Station (EEC)).

Progênie	Populações	
	RMSG	EEC
F1	0,67 (0,17)	0,82 (0,46)
F2	2,00 (0,00)	1,32 (0,33)
F3	1,25 (0,39)	0,94 (0,54)
F4	0,20 (0,12)	0,95 (0,55)
F5	2,00 (0,00)	2,00 (0,00)
F6	2,00 (0,00)	0,91 (0,43)
F7	0,88 (0,59)	2,00 (0,00)
F8	0,71 (0,35)	0,72 (0,27)
F9	1,48 (0,31)	0,74 (0,37)
F10		1,09 (0,47)
F11		0,90 (0,52)
F12		0,85 (0,49)
F13		2,00 (0,00)
F14		0,82 (0,41)
F15		2,00 (0,00)

() Erro padrão obtido a partir de 1.000 reamostragens (bootstrap) sobre locos; RMSG: Reserva Florestal de Santa Genebra; EEC: Estação Ecológica dos Caetetus.

Foram obtidas estimativas negativas para o índice de fixação (Tabela 5), sugerindo excesso de heterozigotos nos locos correspondentes. Isto, juntamente com a grande frequência de cruzamentos biparentais, o reduzido número de alelos por loco (cinco dos 13 locos apresentarem três alelos) e as frequências alélicas distantes de 0,50, podem contribuir para a amplitude de variação verificada nas estimativas, obtidas para as progênies e para os locos, referentes às taxas de fecundação cruzada e índice de fixação. Somado à grande variação nas estimativas dos diferentes locos analisados, o erro padrão confirma a variação na ocorrência de cruzamentos nas progênies estudadas.

Tabela 5. Estimativas de índice de fixação (\hat{F}) e taxa de fecundação cruzada (\hat{i}), por loco analisado, para *Trema micrantha*, nas populações da Reserva Florestal de Santa Genebra (RMSG) e Estação Ecológica dos Caetetus (EEC). (Fixation index (\hat{F}) and outcrossing rate (\hat{i}), estimated with 13 loci, in *Trema micrantha* populations sampled in Santa Genebra Forest Reserve (RMSG) and Caetetus Ecological Station (EEC))

Locos	Populações							
	RMSG				EEC			
	\hat{F}		\hat{i}		\hat{F}		\hat{i}	
Gdh-2	-0,990	(0,647)	0,807	(0,719)	0,990	(0,001)	0,000	(0,000)
Skdh	0,357	(0,787)	0,531	(0,253)	0,222	(0,266)	0,488	(0,172)
Acp-3	-0,990	(0,131)	0,887	(0,356)	-0,990	(0,155)	1,380	(0,205)
Acp-2	-0,990	(0,001)	0,766	(0,166)	-0,607	(0,275)	0,813	(0,083)
Acp-1	0,600	(0,84)	0,885	(0,217)	0,280	(0,719)	0,690	(0,248)
ldh	0,600	(0,860)	0,584	(0,121)	-0,990	(0,001)	0,648	(0,121)
Dest	-0,990	(0,001)	0,848	(0,501)	-0,990	(0,001)	0,535	(0,196)
Mdh-2	0,749	(0,42)	0,688	(0,337)	-0,990	(0,893)	1,999	(0,657)
Mdh-3	0,990	(0,001)	---		0,990	(0,001)	0,075	(0,035)
Mdh-1	0,100	(0,599)	0,539	(0,188)	0,280	(0,672)	0,782	(0,324)
Dia-2	---		---		-0,667	(0,208)	0,958	(0,301)
Got	0,749	(0,242)	0,926	(0,396)	0,406	(0,257)	0,707	(0,123)
G6pdh	0,100	(0,504)	0,959	(0,151)	-0,005	(0,367)	1,034	(0,199)

() Erro padrão obtido a partir de 1.000 reamostragens (bootstrap) sobre progênies; RMSG: Reserva Florestal de Santa Genebra; EEC: Estação Ecológica dos Caetetus; ---: Não testado.

Segundo Coelho (2002), populações finitas (dezenas de indivíduos) e flutuações nas taxas de cruzamento entre gerações, que é uma realidade em populações naturais, resultam em discrepâncias entre estimativas de índice de fixação para diferentes locos. Tais variações refletem nas estimativas de fecundação cruzada, devido a elas estarem sujeitas às alterações próprias da espécie e também resultantes de processos estocásticos da natureza. Dessa forma, um conjunto de fatores pode influenciar na eficiência da aplicação do modelo de cruzamento misto, resultando em estimadores menos robustos.

As estimativas dos parâmetros populacionais indicam que *T. micrantha* é espécie de cruzamento misto, predominando as fecundações cruzadas e, sendo bem flexível quanto aos seus cruzamentos, podem ser produzidas sementes viáveis mesmo em eventos de autofecundação. Na RMSG, verificou-se maior ocorrência de cruzamentos endogâmicos por autofecundação, mas ocorreram proporções semelhantes de cruzamentos biparentais em ambos os fragmentos. As variações entre as estimativas dos diferentes parâmetros de sistema de cruzamento indicam que pode ter havido distúrbios na RMSG, favorecendo a ocorrência de autofecundações que, juntamente com a elevada taxa de cruzamentos biparentais, podem trazer prejuízos para esta população. Por outro lado, as evidências de cruzamentos entre indivíduos aparentados revelaram a ocorrência de estrutura em família na distribuição espacial dos indivíduos em ambas as populações.

A distribuição espacial de *T. micrantha* e a dispersão de seus grãos de pólen pelo vento podem favorecer cruzamentos entre indivíduos mais próximos que coincidem nos seus períodos de florescimento. Por outro lado, as autofecundações podem ser viáveis para a permanência da população em casos de isolamento espacial ou assincronismo na floração, justificando o característico hermafroditismo críptico de *T. micrantha*. Sob tais condições, a fecundação cruzada torna-se função do isolamento espacial dos indivíduos reprodutivos, já tendo sido discutido para *Cavalliesia platanifolia*, por Murawski *et al.* (1990).

T. micrantha apresentou maior índice de fixação na população da RMSG, sugerindo que a fragmentação resultou num aumento de autofecundações e endogamia na população. Esses efeitos genéticos são mais previsíveis em pequenas populações ocupando habitats isolados, sendo que o aumento da endogamia ou homoziguidade na população pode resultar em depressão endogâmica em espécies predominantemente alógamas, por possuírem altos níveis de carga genética.

Nas espécies florestais, de forma geral, a fragmentação atua diretamente sobre o fluxo gênico intra e inter populacional (Karron *et al.*, 1995). No entanto, para *T. micrantha*, que apresentou maior proporção de cruzamentos endogâmicos e biparentais no menor e mais alterado fragmento, a fragmentação está associada a um maior tamanho absoluto da população. A maior densidade deve-se à ação colonizadora da espécie e, por existir menos barreiras aos ventos nesta paisagem, a dispersão de pólen pode ser favore-

cida. Por outro lado, a espécie pioneira estudada é dependente de animais, como primatas, morcegos e aves, para a dispersão de suas sementes. Esses agentes podem ser eficientes na dispersão de propágulos, mas suas populações também estão sujeitas aos impactos da fragmentação, podendo induzir uma dispersão mais ou menos eficiente por longas distâncias.

Os resultados deste estudo contrastam com a teoria de que, em populações naturais, existe o predomínio de cruzamentos aleatórios. Por outro lado, apresentando altas taxas de fecundação cruzada e sendo espécie pioneira, essas características parecem realmente estar associadas à distribuição agregada e ao ciclo de vida curto das espécies deste estágio sucessional. As estimativas indicando cruzamentos entre indivíduos aparentados e cruzamentos biparentais em *T. micrantha* não surpreendem, tratando-se de espécie que apresenta distribuição espacial agregada e polinização por vento.

CONCLUSÃO

- *Trema micrantha* possui sistema de cruzamento misto com predomínio de fecundação cruzada;
- Boa parte dos indivíduos em suas progêneses resulta de cruzamentos biparentais, sendo irmãos completos;
- Com a fragmentação de contínuos florestais e alteração da vegetação, provavelmente, a espécie tende a manter maior endogamia em suas populações e apresentar maiores proporções de cruzamentos correlacionados.

AGRADECIMENTOS

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 da espécie estudada, na Reserva Florestal de Santa Genebra e na Estação Ecológica dos Caetetus, respectivamente. Finalmente, agradecem aos técnicos: Gelson, Andréia e Elza, pela colaboração, e a todos 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*, Washington, v.281, p.103-105, 1998.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I., BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletróforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.

BAKER, H.G. Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution*, Lancaster, v.9, p.347-348, 1955.

BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*, Lancaster, v.28, p.85-92, 1974.

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*, New York, v.72, p.346-356, 1985.

BAWA, K.S.; KRUGMAN, S.L. Reproductive biology and genetics of tropical trees in relation to conservation and management. In: GÓMEZ-POMPA, A.; WHITMORE, T.C.; HADLEY, M. (ed.). **Rain forest regeneration and management**. Paris: UNESCO, 1991. p.119-136.

BROWN, A.H.; MARSHALL, D.R. Evolutionary changes accompanying colonization in plants. In: SCULLDNER, G.E.C.; REVEAL, J.L. (Ed.). **Evolution today**. Pittsburgh: Hunt Institute for Botanical Documentation, 1981. p.351-363.

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

CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J.J.; FUCHS, E.A. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, Cambridge, v.16, p.137-147, 2002.

CLAYTON, J.; TRETIK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, Manitoba, v.29, p.1169-1172, 1972.

CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. *Bioscience*, Washington, v.30, p.814-818, 1980.

COELHO, A.S.G. **Abordagem bayesiana na análise genética de populações utilizando dados de marcadores moleculares**. 2002. 76p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ELLSTRAND, N.C. Gene flow among seed plant populations. *New Forests*, Dordrecht, v.6, p.241-256, 1992.

- FERREIRA, M.B.; GOMES, J.; LOSADA, M. Subsídios para o estudo de *Trema micrantha* (L.) Blume. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26., 1975, Rio de Janeiro. **Trabalhos do...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977. p.175-187.
- HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, New York, v.69, p.1685-1693, 1982.
- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.10, p.173-200, 1979.
- HOWE, H.F. Implications of seed dispersal by animals for tropical reserve management. **Biological Conservation**, Barking, v.30, p.261-281, 1984.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa da vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro, 1993. Escala: 1:5.000.000.
- JANZEN, D.H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980. p.21-30.
- JENNERSTEN, O. Pollination in *Dianthus deltoides* (Caryophyllaceae): effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. **Conservation Biology**, Cambridge, v.2, p.359-366, 1988.
- KAGEYAMA, P.Y. Recomposição da vegetação com espécies arbóreas nativas em reservatórios de usinas hidrelétricas da CESP. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.8, n.25, p.1-43, 1992.
- KARRON, J.D.; THUMSER, N.N.; TUCKER, R.; HESSENAUER, A.J. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. **Heredity**, London, v.75, p.175-180, 1995.
- 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.9-29.
- LEVIN, D.A.; KERSTER, H.W. Gene flow in seed plants. **Evolutionary Biology**, New York, v.7, p.139-220, 1974.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 360p.
- MENGES, E.S. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. **Conservation Biology**, Cambridge, v.5, p.158-164, 1991.
- 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). Logan: Utah State University, 1997.
- MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forests. **Biotropica**, Washington, v.26, p.23-29, 1994.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L.; HUBBELL, S.P.; FOSTER, R.B. Mating systems of two bombacaceous trees of a neotropical moist forest. **Oecologia**, Berlin, v.82, p.501-506, 1990.
- NASON, J.D.; HAMRICK, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, Oxford, v.88, p.264-276, 1997.
- PULLIAM, H.R. Sources, sinks and population regulation. **The American Naturalist**, Chicago, v.132, p.652-661, 1988.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR: version 1.1**. (software). Toronto: University of Toronto, 1994. <http://for.gen.forestry.ube.ca/ritland/dermit.html>
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, London, v.47, p.35-52, 1981.
- SAUNDERS JR., D.A.; HOBBS, R.J.; MARGULES, C.R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, Cambridge, v.5, p.18-32, 1991.
- SHAFFER, M.L. Minimum population sizes for species conservation. **Bioscience**, Washington, v.31, p.131-134, 1981.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.16, p.393-430, 1985.
- SUN, M.; RITLAND, K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. **Heredity**, London, v.80, p.225-232, 1998.
- TORRES, R.B. **Biologia da reprodução de *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae)**. 1996. 140p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

Recebido em 08/05/2005

Aceito para publicação em 26/09/2006

