

MANEJO E REABILITAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS E FLORESTAS SECUNDÁRIAS NA AMAZÔNIA:

Um Simpósio/Workshop Internacional



18 a 22 de Abril de 1993
Hotel Tropical
Santarém, Pará - Brasil



Organizado por:

Instituto Internacional de Floresta Tropical
USDA Serviço Florestal
Estação Experimental Florestal do Sul
Río Piedras, Porto Rico, USA

EMBRAPA/CPATU
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental
Belém, Pará, Brasil

Em colaboração com:

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos
Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Santarém, Pará - Brasil

Com suporte financeiro de:

Programa de Floresta Tropical
Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
Serviço Florestal
Washington, DC, USA

e



Man and the Biosphere (MAB) Programme
UNESCO
Paris, France



684,99
5612 a
1993

VARIABILIDADE ENZIMÁTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.)

João Rodriguez de Paiva¹, e Paulo Yoshio Kageyama²

¹EMBRAPA/CPAA, CP 319, CEP 69048-660, MANAUS, AM

²ESALQ/DCF, CP 9, CEP 13418-900, PIRACICABA, SP

RESUMO

Com o objetivo de fazer inferências sobre a estrutura genética e quantificar a variabilidade genética entre e dentro de 2 populações naturais de seringueiras (*Hevea brasiliensis* (willd.) Muell. -Arg.), através da caracterização iso enzimática, foram coletadas sementes de seringueiras nativas do Estado do Acre. As análises eletroforéticas foram feitas em gel de amido com extratos frescos de folhas jovens, em 4 locos enzimáticos (MDH-1, LAP-1 LAP-2 e SKDH). Os parâmetros de variabilidade estimados demonstram altos níveis de variação genética para as duas populações de seringueira ($H_T = 0,33556$), sendo superiores à média de outras espécies arbóreas tropicais. A maior porção da variabilidade total encontra-se dentro das populações (99,85%). As estimativas das taxas de fertilização cruzada ($t = 64,46\%$ e $64,15\%$) indicam **uma tendência desta espécie pertencer ao grupo de plantas intermediárias, quanto ao sistema de cruzamento.**

Palavras Chaves: Seringueira, população natural, eletroforese, taxa de cruzamento, endogamia.

INTRODUÇÃO

A grande variabilidade genética natural da seringueira é uma das principais riquezas de que dispõem os melhoristas para ampliar a potencialidade de cultivo desta espécie (Gonçalves *et al.*, 1983), principalmente nas regiões tradicionais que, apesar da tradição do cultivo da seringueira, têm excelentes condições climáticas, favoráveis ao desenvolvimento de doenças.

No entanto, o aproveitamento racional da variabilidade genética das populações naturais têm sido modesto, considerando o seu potencial, e totalmente direcionado para a obtenção de clones produtivos e resistentes às doenças (Brasil 1971).

A medida em que novos conhecimentos são adquiridos sobre a forma de organização, manutenção e distribuição da variabilidade genética das espécies tropicais, se fortalece a hipótese que o cultivo racional de uma espécie em ambiente tropical tem que, obrigatoriamente, conviver em equilíbrio com os fatores bióticos do ecossistema, caso contrário está fadado ao insucesso. Além do mais, esses conhecimentos das populações naturais obviamente proporcionarão maior exploração do

potencial de variabilidade genética existente, tanto para uso direto, pelo melhoramento genético, como para orientar a coleta, a amostragem e a preservação de germoplasma de seringueiras nativas.

Através de caracterização isoenzimática, objetiva-se estimar alguns parâmetros genéticos populacionais e quantificar o nível de variabilidade genética existente em duas populações naturais de seringueiras.

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado se constituiu de plantas, oriundas de sementes de seringueiras, coletadas em duas populações naturais, localizadas na área da EMBRAPA/UEPAE-Rio Branco e Reserva Florestal do Catuaba, pertencente a Universidade Federal do Acre (UFAC), situadas nos Km 14 e 22 da rodovia BR 364, respectivamente, no Estado do Acre.

As análises de eletroforese foram feitas em 26 e 27 famílias de plantas, respectivamente para a população 1 e 2, com número variável de 14 a 24 plantas/família, no Laboratório de Genética Biologia Reprodutiva do DCF/ESALQ, em Piracicaba (SP).

Os sistemas enzimáticos utilizados foram o malato desidrogenase (MDH) - EC 1.1.1.37, shiquimato desidrogenase (SKDH) - EC 1.1.1.25 e leucina aminopeptidase (LAP) - EC 3.4.11.1 (Lebrun & Chevallier 1988) (Tabela 1).

Para cada alelo identificado foi feita uma análise de variância no modelo hierárquico desbalanceado (Anderson & Bancroft 1952; Weir 1990). Pelas estimativas dos componentes de variância foram calculados o coeficiente médio de endogamia de todas as plantas nas duas populações (F); a taxa de fertilização cruzada da espécie (t) e a distância genética entre populações ($\hat{\epsilon}_2$) (Weir 1990; Vencovsky 1992).

Na análise dos dados com perda da estrutura de famílias por população, foi utilizado o programa de computador BIOSYS-1 (Swofford 1989) que fornece estimativas dos F's estatístico de Wright (1978), e da a distância de Nei (1972) entre populações. A diversidade genética entre

populações foi estimada também pelos parâmetros de Nei (1973).

As taxas de fertilização cruzada e os coeficientes de endogamia dentro das populações também foram estimadas, através das frequências esperadas (H_e) e observadas (H_o) de heterozigotos, conforme Li (1955) e Weir (1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sistema leucina aminopeptidase (LAP) foram identificados dois locos (LAP-1 e LAP-2). No LAP-1 foram identificados cinco alelos que, por convenção, denominou-se de alelo 1 para o mais comum, alelos 2 e 3 para aqueles que apresentaram RM's (migração relativa) superiores a 1, respectivamente, e alelos 4 e 5 para aqueles que apresentaram RM's inferiores a 1 (Tabela 1). No loco LAP-2, de migração mais lenta, foram identificados quatro alelos, com o alelo 2 apresentando RM superior a 1 e os demais, valores inferiores. No sistema

TABELA 1. Sistema enzimáticos, abreviações, tampões, aloenzimas e mobilidade relativa (RM).

ENZIMA	ABREVIACÕES	TAMPÕES*			ALOENZIMA	RM
		ELETRODO	GEL	COLORAÇÃO		
Malato desidrogenase EC 1.1.1.37	MDH-1	A	B	C	1	100
					2	90
					3	80
Shiquimato desidrogenase EC 1.1.1.25	SKDH	A	B	C	1	100
					2	115
					3	98
				4	76	
				5	56	
Leucina aminopeptidase EC 3.4.11.1	LAP-1	A	B	D	1	100
					2	107
					3	116
					4	93
				5	87	
	LAP-2	A	B	D	1	100
					2	113
					3	91
					4	76

* - A: Tris citrato pH 6,6; B: Histidine 0,05M pH 6,0; C: Tris HCl pH 8,5 e D: Tris Maleato pH 5,4 (Lebrun & Chevallier 1988).

shiquimato desidrogenase (SKDH) foi identificado somente um loco com cinco alelos. O alelo 2 apresentou RM superior a 1.

O sistema malato desidrogenase (MDH) apresentou um padrão de bandas de difícil interpretação de todos os seus locos. Neste sistema, foi identificado e analisado o loco mais rápido, apresentado três alelos. O alelo 3, mais lento, se sobrepôs ao alelo mais rápido de um outro possível loco.

A estrutura monomérica das enzimas SKDH e LAP está em concordância com os resultados apresentados por Irca (1986), Chevallier *et al.* (1984) e Chevallier (1988) e em discordância quanto ao número de alelos por loco. O número de alelos por loco, para ambos sistemas, foi superior àqueles analisados anteriormente, apresentado, portanto, maior variabilidade genética nessas populações.

A taxa média de cruzamento para a seringueira em populações naturais foi de 64,46% e o coeficiente médio de endogamia foi de 21,81% (Tabela 2), estimados pela metodologia de Weir (1990). Esses mesmos coeficientes, estimados pela metodologia de Li (1955), foram de 64,15% e 21,84%, respectivamente.

Para os melhoristas de seringueira, a taxa de cruzamento natural da espécie sempre foi uma incógnita, apesar da sua grande importância na definição de estratégias de melhoramento e no entendimento da estrutura genética das populações.

O'Malley *et al.* (1988), utilizando a metodologia de multilocos, estimaram uma taxa de cruzamento de $t = 0,85 \pm 0,03$ para a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), destacando que a alogamia é predominante nesta espécie, porém não descartou a possibilidade de ocorrer baixos níveis de endogamia.

Como se pode constatar, a taxa média de endogamia para a seringueira, em populações naturais, esteve sempre acima de 20%. Com este resultado não se pode afirmar que a endogamia tenha sido originada de autofecundação das plantas, ou seja, como a taxa de fertilização cruzada é cerca de 64%, a taxa de autofecundação seria de 36%, tendo em vista que a endogamia pode também ser originada do cruzamento entre plantas aparentadas.

Simmonds (1989) relata que os estudos sobre polinização cruzada, em plantios de seringueira, aparentemente não têm sido muito bem entendidos, pelo fato da ocorrência de plantas anãs, causada, possivelmente, pela autofecundação de plantas em jardins de sementes de boa procedência. Este autor também destaca que a taxa de autofecundação varia em torno de 16%-28%. Relata, ainda, que a taxa de autofecundação estimada para o clone PB 5/51, no Prang Besar (empresa privada de plantio de seringueira na Malásia), foi de 22%.

Os parâmetros de variabilidade estimados demonstraram altos níveis de variação genética para as duas populações em conjunto ($H_T = 0,3356$) (Tabela 3), e que a maior proporção de variabilidade encontra-se dentro da população (99,85%).

A maior proporção observada para a variabilidade, contida dentro das populações de seringueira, é indicativo que a coleta de seringueira para a conservação de recursos genéticos pode ser direcionada para uma ou poucas populações, em uma determinada região de coleta, e um maior número de indivíduos por população. Com este procedimento, coleta-se maior representatividade genética da espécie a um custo menor.

Chevallier (1988) já havia destacado que o alto índice de variação da seringueira, em seu local de origem, estaria de acordo com o caráter perene da espécie, o presumível modo de cruzamento como forma de reprodução e a maneira de dispersão das sementes por animais ou pelo rio, como fatores que atuam para a manutenção dos altos níveis de variação na população.

Assim é que, nos seringais nativos do Estado de Rondônia, Gonçalves (1981) observou que o porte das seringueiras de terra firme (áreas não sujeitas a inundações) é bem superior ao das seringueiras situadas em área de várzeas (áreas sujeitas a inundações periódicas). Destacou ainda o autor que existe grande variação nas populações naturais para as características de circunferência do caule, período de queda de semente, características da casca, tamanho de semente, formato da copa e densidade de árvores por hectare.

Por outro lado, Paiva (1981), observando os seringais nativos do Estado de Mato Grosso, destacou a existência de menor variabilidade entre plantas nos seringais de terra firme, em comparação

TABELA 2. Estimativas do coeficiente de endogamia (f e F) e da taxa de fertilização cruzada (t) para 17 alelos em 4 locos de 2 populações naturais de seringueira¹.

LOCOS	LI (1955)*		WEIR (1990)	
	f	t	f	t
LAP-1	0,1644 (0,0288)	0,7176 (0,0424)	0,1664 -	0,7147 -
LAP-2	0,2179 (0,0412)	0,6422 (0,0577)	0,2099 -	0,6530 -
SKDH	0,2481 (0,0257)	0,6024 (0,0173)	0,2488 -	0,6008 -
MDH-1	0,1956 (0,0755)	0,6728 (0,1058)	0,2535 -	0,6502 -
MÉDIA	0,2184	0,6415	0,2181	0,6446

¹Adaptado de Paiva *et al.* (1992a e 1992b).

²Valores entre parenteses correspondem aos desvios padrões.

TABELA 3. Diversidade genética total (H_T), dentro da população (H_S), entre populações (D_{ST}) e proporção da diversidade entre em relação a total (G_{ST}) para 4 locos em 2 populações naturais de seringueiras.

LOCOS	N*	H_T	H_S	G_{ST}	D_{ST}
LAP-1	1020	0,3109	0,3096	0,0042	0,0013
LAP-2	962	0,2211	0,2206	0,0023	0,0005
SKDH	853	0,6253	0,6239	0,0022	0,0014
MDH-1	976	0,0726	0,0712	0,0193	0,0014
MÉDIA	3811	0,3356	0,3351	0,0003	0,0001

*Número total de plantas analisadas nas 2 populações.

com seringais de várzeas, para as características de forma, tamanho e coloração de sementes. Levantou também a hipótese de que os seringais em áreas de várzeas devem apresentar maior variabilidade genética, devido ao mecanismo de dispersão de sementes pelo rio, que favorece uma dispersão (fluxo gênico) mais ampla e maior concentração de tipos diferentes por área ocupada.

As estimativas do índice de identidade gênica normalizado de Nei (1972), para as duas populações estudadas de seringueira, apresentou o valor de 0,997 e para a distância genética o valor de 0,003, indicando que as duas populações estão geneticamente muito próximas.

A diversidade genética entre as duas populações, estimada pelos índices D_{ST} (Nei 1973),

F_{ST} (Wright 1978) e $\hat{\epsilon}_2$ (Weir 1990) para a média dos quatro locos nas duas populações, foi também muito baixa (Tabela 4).

Como se pode observar, as estimativas que avaliam as diferenças genéticas entre populações, utilizando metodologias diferentes, apresentaram valores baixos e similares, levando à conclusão de que as duas populações estudadas de seringueiras nativas são geneticamente semelhantes. Isto, de certo modo, já era esperado, considerando a distância entre os dois seringais e por situarem-se em área de terra-firme que, comparado aos seringais de várzeas, fenotipicamente são mais semelhantes. Estes resultados mostram também que houve um fluxo gênico entre os dois grupos de plantas, uma vez que, apesar da aparente descontinuidade entre os dois grupos, o processo de diferenciação mostra-se ainda incipiente.

Os ecossistemas tropicais, sem dúvida, apresentam maior diversidade de espécies e maior complexidade nas interações entre organismos. A diversidade é resultante da somatória de vários fatores interagindo no ecossistema. Como consequência, os indivíduos de uma espécie, de certa forma, ficam isolados entre outros indivíduos de outras espécies. Isso tem implicações na dinâmica da floresta, em termos de interação planta x animal, os quais são interdependentes e bem coadaptados, dando uma integração e estabilidade ao ecossistema (Pianka 1983).

Baseado nesses argumentos, pode-se inferir que cada espécie da floresta tropical desenvolveu

estratégias próprias de adaptação, objetivando conviver harmonicamente e em equilíbrio dinâmico com a heterogeneidade do ecossistema. O que se pode inferir, ainda, é que as estratégias utilizadas por uma espécie podem não servir de referência para outras espécies.

Desse modo, é aceitável admitir que a taxa de cruzamento natural, estimada para a seringueira, apesar de baixa para os padrões de uma espécie tida como alógama, assim como o grau endogamia da espécie, sejam estratégias biológicas desenvolvida pela espécie, para poder manter o equilíbrio no ecossistema tropical. É sabido que a seringueira cultivada em ambiente tropical, é dizimada pelo patógeno (*Microcyclus ulei*) e, no entanto, convive com esse fungo harmonicamente em equilíbrio, nas populações naturais, o que reforça a tese levantada.

CONCLUSÕES

- O grau de variabilidade estimado nas duas populações demonstram altos níveis de variação genética e a maior parte encontra-se dentro da população;
- Os parâmetros que medem a distância genética entre as duas populações indicam que são semelhantes e a coleta de germoplasma de seringueira deve ser dirigida a uma população, com um maior número de indivíduos;
- As baixas estimativas das taxas de fertilização cruzada da seringueira em populações naturais, indicam uma tendência desta espécie pertencer

TABELA 4. Estimativas de distância genética para 17 alelos em 4 loci de 2 populações naturais de seringueira.¹

LOCOS	NEI (1973)	WRIGHT (1978)	WEIR (1990)
	D_{ST}	F_{ST}	$\hat{\epsilon}_2$
LAP-1	0,0013	0,0040	0,0000
LAP-2	0,0005	0,0030	-0,0001
SKDH	0,0014	0,0020	-0,0008
MDH-1	0,0014	0,0180	0,0531
MÉDIA	0,0001	0,0067	0,0025

¹Adaptado de Paiva (1992).

ao grupo de plantas intermediárias, quanto ao sistema de cruzamento.

REFERÊNCIAS

- Anderson, R.L. x Bancroft, T.A. *Statistical Theory in Research*. New York, McGraw-Hill, 1952. p. 324.
- Brasil. Sudhevea. Melhoramento genético da seringueira. In: *Plano Nacional de Borracha*. Anexo 11. Pesquisa e experimentação com a seringueira. Rio de Janeiro, 1971. p. 15-36.
- Chevallier, M.H.; Lebrun, P. x Normand, F. Approach to the genetic variability of germplasm using enzymatic markers. In: *Colloque Exploitation-Physiologie et Amelioration de L'Hevea*, Montpellier, 1984. *Compte Rendu*. Montpellier, IRCA/GERDAT, (1984). p. 365-376.
- Chevallier, M.H. Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isozyme markers. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, 3:42-53, 1988.
- Gonçalves, P.S. Expedição Internacional à Amazônia no Território Federal de Rondônia para coleta de material Botânico de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Manaus, EMBRAPA-CNPDS, 1981. 60 p. (EMBRAPA-CNPDS. Relatório de viagem).
- Gonçalves P.S.; Paiva, J.R. de x Souza, R.A. de. *Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (Hevea spp) no Brasil e em países asiáticos*. Manaus, EMBRAPA-CNPDS, 1983. 69 p. (EMBRAPA. CNPDS. Documento, 2).
- Institute de Recherches Sur le Caoutchouc. Laboratoire d'électrophorèse. In: *Repport Annuel: 1985*. Paris, IRCA, 1986. p. 33-5.
- Lebrun, P. x Chevallier, M.H. Sstarch and polyacrylamide gel electrophoresis of *Hevea brasiliensis*: a laboratory manual. Montpellier, IRCA/CIRAD, 1988. 44 p.
- LI, C.C. *Population Genetics*. Chicago. The University of Chicago. Press. 1955. 366 p.
- Nei, M. Genetic distance between population. *Am. Nat.*, 106:283-92. 1972.
- Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:3321-23. 1973.
- O'Malley, D.M.; Buckley, D.P.; Prance, G.T.; Bawa, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl: 929-32. 1988.
- Paiva, J.R. I coleta de material sexuado e assexuado em seringais nativos do Estado de Mato Grosso. Manaus, EMBRAPA-CNPDS, 1981. 26 p. (EMBRAPA-CNPDS. relatório).
- Paiva, J.R. de. Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.) Piracicaba, ESALQ/USP, 1992. 145 p. (Tese de Doutorado).
- Paiva, J.R.; Kageyanam P.Y. x Vencovsky, R. Genetiçs of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* (willd.) Muell. -Arg.). 2. Mating System. *Silvae Genetica*. 1992a. (no prelo).
- Paiva, J.R.; Kageyama, P.Y. x Vencovsky, R. Taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia em seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. - Arg. *Rev. Brasil. Genet.* 1992b. (no prelo).
- Pianka, E.R. *Evolutionary ecology*. New York, Harper & Row. 486 p. 1983.
- Simmons, N.W. Rubber breeding. In: Webster, C.C.; Baulkwill, W.J. *Rubber*. Singapore Loughman Scientific and Technical. 1989. 615 p.
- Swofford, D.L. *Biosys-1: User's Manual*. Illinois. 1989. 43 p.
- Vencovsky, R. Análise da variândefrequências alélicas. *Rev. Brasil. Genet.* 15(1). Suplemento 1. 53-60. 1992.
- Wright, S. Evolution and genetics of populations, vol. 4, *Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago. 1978.
- Weir, B.S. *Genetic data analysis: Methods for discrete populations genetic data*. Suderland Sinauer Associates, 1990. 377 p.