

Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) B. considerando diferentes estádios de vida

Genetic structure in a population of *Trema micrantha* (L.) B. for different life stages

Luciano Arruda Ribas
Paulo Yoshio Kageyama

RESUMO: Espécies do primeiro estágio sucessional possuem características ecológicas próprias resultantes da existência de banco de sementes e da longa distância de dispersão de suas sementes. Este trabalho visou quantificar e comparar a distribuição da diversidade genética presente nos diferentes estádios de vida (sementes do solo, progênies e árvores do dossel) em uma população natural da espécie pioneira *Trema micrantha* (Ulmaceae), avaliando o banco de sementes como um potencial tampão gênico para a espécie. Amostraram-se folhas de 69 árvores do dossel, de plântulas de 10 progênies, além de 100 plântulas obtidas a partir do banco de sementes do solo. A coleta de solo foi realizada em cinco clareiras, das quais foram amostradas as árvores do dossel, escolhidas ao acaso na Reserva Florestal Mata de Santa Genebra, um fragmento com 252 ha de floresta tropical semidecídua, no município de Campinas, SP. A diversidade genética foi avaliada por polimorfismo isoenzimático. Os resultados revelaram alta diversidade genética na população. As estimativas para o índice de fixação e divergência genética entre subpopulações obtidas nos diferentes estádios de vida sugerem significativas proporções de cruzamentos endogâmicos, acirrada competição nas etapas de germinação e desenvolvimento das plântulas altamente heterozigotas e importante participação dos agentes dispersores de sementes na realização do fluxo gênico intra e interpopulacional.

PALAVRAS-CHAVE: Sucessão florestal, Diversidade genética, Isoenzimas, Banco de sementes

ABSTRACT: Species of the first successional level present ecological characteristics resultant from the seed bank existence and from the long distance dispersal of its seeds. This work aimed to quantify and to compare the genetic diversity distribution in the different life stages (soil seeds, progeny and adults plants from the dossel) in a natural population of the tropical pioneer tree *Trema micrantha* (Ulmaceae), evaluating the seed bank as a potential genetic buffer for this species. Leaves of 69 trees and of seedlings of 10 progenies, and from 100 seedlings from the soil seeds were sampled. The soil collection was performed in five natural gaps in the Reserva Florestal de Santa Genebra, a fragment with 252 ha of decidual tropical forest, in Campinas, São Paulo State-Brazil. The genetic diversity was evaluated for allozyme variation. The results revealed high genetic diversity in the population. The fixation indices and the genetic differentiation estimates among different life stages suggested significant proportions of inbreeding in the mating system, competition during seed germination and seedling development with selection favoring heterozygosity and important participation of the seed dispersor agents in the achievement of the intrapopulation gene flow.

KEYWORDS: Forest succession, Genetic diversity, Allozyme, Seed bank

INTRODUÇÃO

Espécies do primeiro estágio sucessional, conhecidas como pioneiras, são consideradas possuidoras de características próprias de extinção

local e recolonização, podendo resultar no aumento do fluxo gênico e redução da diferenciação genética entre populações (Slatkin, 1985; Slatkin, 1987). A existência de banco de sementes e a

longa distância de dispersão de pólen e sementes apresentam importantes conseqüências genéticas e ecológicas para estas espécies. Exemplo destas é a possibilidade do banco de semente agir como tampão gênico, sendo capaz de repor a diversidade genética perdida pela população do dossel, fazendo a dispersão de sementes e pólen reduzir a distância genética entre populações geograficamente distantes (Alvarez-Buylla e Garay, 1994). Estudos teóricos resultaram em modelos primeiramente desenvolvidos para espécies anuais e poucos estudos empíricos comparam a estrutura genética de bancos de sementes com outros estádios de vida (Tonsor et al., 1993; Alvarez-Buylla e Garay, 1994; Alvarez-Buylla et al., 1996).

O banco de sementes é caracterizado como a quantidade de sementes existente numa determinada área de solo, num dado momento. Ele é entendido como um sistema dinâmico, com entrada de sementes via dispersão e chuva de sementes e saída por predação, doenças ou germinação. O balanço entre estes processos é que determina a taxa de renovação do banco de sementes num determinado local (Hyatt e Casper, 2000).

Funções ecológicas têm sido propostas para as sementes sobreviventes por longos períodos no banco de sementes. Elas podem agir como uma reserva de propágulos, tornando o banco de sementes com potencial para reduzir a probabilidade de extinção de populações (Cohen, 1966; Venable e Brown, 1988). Como o banco de sementes contém alelos que podem estar presentes em diferentes freqüências em relação à população sobre o solo, o banco de sementes pode afetar a taxa de evolução ou mudar a estrutura genética da população de árvores do dossel (Levin, 1990). Característico de espécies especializadas em clareiras, o banco de sementes pode facilitar a coexistência de espécies potencialmente competitivas (Pake e Venable, 1995). Finalmente, ele pode perfeitamente ser o principal recurso da comunidade de plantas seguindo mudanças ambientais, tais como queda de árvores, restauração de área alterada e mesmo queimadas, todos com potencial para acionar a germinação de sementes dormentes (Hyatt e Casper, 2000). Sobre tudo, tais funções dependem da persistência das sementes no solo.

Dessa forma, estreitas relações parecem existir entre o banco de sementes no solo e a evolução e dinâmica genética da população de plantas da mesma espécie. No entanto, muitas questões ainda permanecem sem respostas. Percebe-se que a similaridade genética do banco de sementes com a população de árvores do dossel depende de uma complexa relação entre o sistema reprodutivo, distância de dispersão de sementes, padrão espacial e temporal de seleção, variação na sobrevivência e fecundidade. Estes são fatores que afetam a longevidade das sementes nos bancos de sementes e da proporção de mudas resultantes da germinação de sementes do banco persistente no solo em relação àquelas originadas do último evento reprodutivo (Tonsor et al., 1993).

Obviamente, o entendimento das mudanças entre as populações do banco de sementes e das plantas reprodutivas depende de um vasto conjunto de informações ecológicas e genéticas sobre a espécie de interesse. O conhecimento da distribuição da diversidade genética, ao longo de diferentes estádios de vida na mesma população, torna-se muito útil para o entendimento das forças evolucionárias na estruturação genética da espécie. Considerando modelos de simulação, a dispersão das sementes diminui a estrutura genética espacial encontrada entre as plantas produtoras das sementes (Rohlf e Schnell, 1971; Turner et al., 1982). No entanto, é necessário considerar que o mecanismo de polinização, a densidade de adultos, a presença do banco de sementes e a seleção microambiental também participam da estruturação genética populacional, devendo ser diferente para diferentes espécies de plantas.

Sob esse aspecto, realizando-se a amostragem em clareiras e obtendo-se as estimativas dos parâmetros de diversidade genética intra e interpopulacional para diferentes estádios de vida, espera-se que a importância da dispersão de sementes para a espécie se manifeste através da diminuição da diversidade genética interpopulacional estimada para sementes do banco em relação às progênies e árvores do dossel. Por outro lado, a permanência de semente no banco de solo, por sucessivos eventos reprodutivos, também pode ser responsável pela diminuição da

estrutura genética espacial no banco de sementes. Se existir um favorecimento de genótipos em diferentes clareiras (seleção microambiental), espera-se obter estimativa interpopulacional maior para a população do dossel em relação ao banco de sementes do solo. Além disso, se genótipos heterozigotos trouxerem vantagens competitivas serão verificados menores níveis de endogamia na população de árvores do dossel.

Diante de tais considerações, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de quantificar e entender a estruturação genética na população de plantas amostradas no dossel da floresta, na população de progênies e também na população de sementes presente no banco de solo, para a espécie pioneira *Trema micrantha*.

MATERIAL E MÉTODOS

A diversidade genética foi avaliada através do polimorfismo de isoenzimas e os resultados foram avaliados quanto à influência dos agentes dispersores, da demografia associada às clareiras e quanto à participação do banco de sementes na manutenção da diversidade genética na população.

Espécie estudada

Neste estudo, foram amostradas subpopulações da espécie pioneira *Trema micrantha* (L.)B., Ulmaceae. Esta espécie ocorre em praticamente todos os tipos de formações florestais e é uma das primeiras a se estabelecer em clareiras e áreas abandonadas, a partir do banco de sementes do solo (Lorenzi, 1992; Durigan et al., 2002). Está presente entre as latitudes 300N (Estados Unidos) e 300S (Brasil) e é classificada como hermafrodita críptica por possuir indivíduos variando de monóicos a dióicos (Torres, 1996). Suas flores são unissexuais ou bissexuais andrógenas, polinizadas principalmente pelo vento e a dispersão das suas sementes é por zoocoria, envolvendo grande diversidade de aves (Carvalho, 1994).

Locais de estudo

A amostragem foi realizada na Reserva Florestal Mata de Santa Genebra (RMSG), a qual possui 251,8 ha de floresta tropical estacional semidecí-

dua, localizada nas coordenadas 22° 49' S e 47° 06' 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 18 metros de altura com espécies emergentes de até 25 m, como áreas muito perturbadas ocupadas por espécies de estágio sucessional inicial (Leitão Filho, 1995). Neste fragmento, além dos processos naturais que estimulam a regeneração, ocorreram perturbações antrópicas como queimadas, extração seletiva de madeiras e retirada de lenha.

Amostragem

Banco de sementes do solo

Na RMSG, foram localizadas cinco áreas com ocorrência de *T. micrantha*. Dentre estas, três corresponderam a grandes clareiras abertas, provavelmente por retirada de madeira e ocorrência de incêndio. As outras duas coincidem com áreas menos perturbadas, com vegetação arbustiva predominante e as clareiras se devem à abertura de estreitas estradas de acesso.

Foram coletadas 100 amostras da camada superior do solo (50x50 cm, com 5 cm de profundidade) em janeiro de 2001, utilizando-se um gabarito de madeira nas dimensões desejadas (0,5 x 0,5 m). Considerando a camada de liteira, as amostras foram coletadas ao acaso, sendo vinte pontos de coleta para representar cada uma das cinco referidas áreas deste fragmento. O solo amostrado foi acondicionado em sacos de polietileno com identificação referente e transportado para o viveiro de espécies florestais do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. O solo foi distribuído aleatoriamente em esquadria de madeira constituindo canteiros, onde foi monitorado e irrigado diariamente. Os canteiros foram montados sobre lona plástica preta, de forma que cada amostra do solo foi transferida para um espaço com as mesmas dimensões.

Todas as 1054 plântulas de *T. micrantha* que regeneraram do banco foram envolvidas em papel alumínio, identificadas quanto ao quadrante

referente, imersas em nitrogênio líquido e levadas para armazenamento em freezer a 80°C negativos. Armazenadas desta forma, 100 plântulas, sendo 20 obtidas ao acaso dentro das cinco clareiras, foram utilizadas para as análises em laboratório.

Árvores do dossel

Foram coletadas folhas jovens de 69 plantas de *T. micrantha* existentes naquelas mesmas clareiras e transportadas para análise genética em laboratório. As amostras permaneceram em caixa de isopor contendo gelo e foram processadas no Laboratório de Genética e Reprodução de Espécies Arbóreas (LARGEA), na ESALQ/USP.

Progênes

Frutos de *T. micrantha* foram coletados de 10 árvores individualmente e levados ao laboratório de sementes de espécies florestais do Departamento de Ciências Florestais, ESALQ-USP, onde foram lavados com auxílio de uma peneira. As sementes (diásporos) receberam tratamento para acelerar a germinação (Torres, 1996), foram dispostas sobre papel de germinação, dentro de caixas de gerbox e mantidas em germinador. No germinador, foram submetidas às condições de fototropismo com 8 horas de escuro e 16 de luz, e à temperatura alternada de 30°C sob luz e 20°C quando em escuro. As plântulas foram repicadas para substrato e transferidas para casa de vegetação, onde foram mantidas até as análises de isoenzimas. A população de progênes foi representada por dez progênes, com dez indivíduos cada.

Protocolos

Previamente à aplicação da técnica de eletroforese horizontal de isoenzimas, testou-se quatro sistemas tampão gel/eletrodo, combinados com 32 sistemas enzimáticos, para as plântulas e também para as árvores do dossel. Durante a extração, utilizou-se o tampão 1 citado em Alfenas et al. (1991). Todo o procedimento utilizado durante a aplicação da técnica seguiu as indicações dos mesmos autores.

Feita a seleção, as enzimas foram extraídas das plântulas de *T. micrantha* referentes às progê-

nies e banco de sementes, e submetidas para revelação da glutamato oxaloacetato transaminase (GOT, EC-2.6.1.1), diaforase (DIA, EC-1.8.1.4), glucose-6-fosfodesidrogenase (G6PDH-1.1.1.49), isocitrato desidrogenase (IDH, EC-1.1.1.42), glucose desidrogenase (GDH, EC-1.1.1.47), malato desidrogenase (MDH, EC-1.1.1.37), xiquimato desidrogenase (SKDH, EC-1.1.1.25) e fosfogluco isomerase (PGI, EC-5.3.1.9). Durante a eletroforese, as enzimas IDH, GDH, MDH e SKDH apresentaram melhor padrão de revelação e resolução sob o sistema tampão gel/eletrodo desenvolvido por Clayton e Tretiak (1972), que é citado com algumas modificações em Alfenas et al. (1991), como sistema 8. Para as outras enzimas (GOT, G6PDH, DIA e PGI), optou-se pelo sistema tampão gel/eletrodo desenvolvido por Hakim-Elahi (1980), citado por aqueles autores como sistema 25. Da interpretação dos zimogramas, foram obtidos genótipos a partir de nove locos isoenzimáticos polimórficos, somando-se 20 alelos.

Para as árvores do dossel, revelaram-se 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, citado em Alfenas et al. (1991). Nesta etapa, somaram-se oito locos polimórficos, num total de 20 alelos.

Análises estatísticas

A caracterização da diversidade genética existente nas clareiras foi realizada baseando-se nos genótipos dos locos polimórficos para cada um dos três estádios de ciclo de vida amostrados. Os parâmetros de diversidade genética intrapopulacional utilizados foram: heterozigiosidade esperada sob condições de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e), heterozigiosidade observada (\hat{H}_o) e o índice de fixação (f).

A estrutura genética foi estudada pela análise da variância das frequências gênicas (Weir, 1996)

quando se considerou as cinco clareiras dentro da RMSG como populações. Apenas para as progênies não se distinguiu sua coleta por clareira, considerando-se cada progênie separadamente. Os parâmetros estimados foram: índice de fixação médio dentro da população (\hat{f}); índice de fixação total da população ($\hat{\theta}_p$) e divergência genética entre populações (\hat{F}). Para verificar se as estimativas médias destes parâmetros eram diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança a 95% de probabilidade pelo método de reamostragem bootstrap, utilizando-se 1.000 repetições sobre locos. As análises de variância descritas acima, os bootstraps, bem como as estimativas de diversidade genética intrapopulacional, foram obtidos com o auxílio do programa GDA de Lewis e Zaykin (2000).

Comparações entre estádios de vida

Baseando-se na caracterização genética realizada para populações de árvores do dossel, progênies e de sementes do banco do solo, comparou-se a diversidade genética existente e sua distribuição nos três estádios de vida. Além disto, analisou-se a distribuição das freqüências alélicas nos locos para verificar a existência de diferenças significativas entre as populações destes estádios. Para tanto, utilizaram-se apenas os seis locos isoenzimáticos comuns aos diferentes estágios, sendo eles: Got, Dia-2, Idh, Gdh-2, Mdh-2 e Skdh, os quais somam 15 alelos.

O teste para verificar a existência de diferenças nas freqüências alélicas entre as populações dos diferentes estádios de vida (árvores do dossel, plântulas do solo e de progênies) foi realizado através do programa TFGA, desenvolvido por Miller (1997). Realizaram-se comparações entre as populações e se testou a hipótese de que a distribuição dos alelos é idêntica nas gerações. A metodologia utilizada para a análise foi descrita por Raymond e Rousset (1995) e o procedimento assume que os dados provenientes de cada loco são independentes entre si. Foram utilizadas 10 baterias de testes, com 2.000 permutações por bateria, quando se realizaram comparações entre as populações dos diferentes estádios de vida.

RESULTADOS

Como se pode observar na Tabela 1, ocorrem variações nas freqüências alélicas dos locos analisados entre os estádios de vida. Para o loco Got apenas o alelo c não ocorre nos três estádios de vida amostrados, estando presente apenas nas progênies produzidas no período. Neste loco, o alelo b é bastante freqüente nas progênies enquanto é o alelo a o mais freqüente na população do dossel e no banco de sementes.

Tabela 1

Freqüências alélicas nas populações de árvores do dossel, progênies e do banco de sementes do solo de *Trema micrantha*, localizadas na RMSG. (Allelic frequencies in populatins of adults, tree seeds and soil seeds of *Trema micrantha*, on Santa Genebra Reserve)

Locos	Alelos	Dossel	Progênies	Banco
Got	a	0,637	0,091	0,652
	b	0,363	0,719	0,348
	c	0,000	0,189	0,000
Dia-2	a	0,405	0,268	0,326
	b	0,349	0,708	0,623
	c	0,246	0,024	0,050
Idh	a	0,177	0,149	0,193
	b	0,823	0,851	0,807
Gdh-2	a	0,934	0,940	0,910
	b	0,066	0,060	0,090
Mdh-2	a	0,008	0,798	0,276
	b	0,946	0,143	0,693
	c	0,046	0,059	0,031
Skdh	a	0,388	0,747	0,392
	b	0,612	0,253	0,608

Variações nas freqüências de alelos entre estádios de vida também ocorrem para Skdh e Mdh-2. Ambos locos tiveram o alelo a mais freqüente nas progênies enquanto o alelo b foi mais freqüente no banco e nas árvores do dossel. Por outro lado, os alelos mais freqüentes coincidiram nos locos Dia-2, Idh e Gdh-2.

As variações nas estimativas de diversidade e sua distribuição verificada entre as populações de *T. micrantha* nos diferentes estádios de vida, também podem ser observadas nos resultados do teste de diferenciação de freqüências alélicas (Tabela 2). Verifica-se que 44% das comparações

indicaram haver algumas semelhanças nas frequências alélicas nos diferentes locos (probabilidades maiores que 5%), estando os extremos nos locos Gdh-2 e Mdh-2, podendo ser confirmados pela distribuição das frequências alélicas apresentada na Tabela 1. Sobretudo, as estimativas dos testes qui-quadrado (grau de liberdade igual a 12 e 95% de probabilidade) rejeitam a existência de igualdade na distribuição das frequências alélicas entre as populações nos diferentes estádios de vida.

As estimativas de diversidade genética intrapopulacional (Tabela 3) variaram entre os diferentes estádios de vida, sendo que as menores proporções de heteroziguidade se referem à população de progênies (0,218 e 0,263 para heteroziguidade esperada e observada, respectivamente). As mesmas estimativas foram próximas entre a população de árvores do dossel (0,351 e 0,420) e a de sementes do solo (0,394 e 0,404). As estimativas de heteroziguidade observadas foram superiores às esperadas nos três estádios de ciclo de vida, tendo sido obtidos índice de fixação negativos para todos estádios (-0,205, -0,225 e -0,027, respectivamente para a população de árvores do dossel, progênies e do banco de sementes).

Considerando os parâmetros de estruturação genética (Tabela 4), observa-se que as estimativas do índice de fixação intrapopulacional prevalecem negativas nas subpopulações dos três estádios de vida (-0,186, -0,231 e -0,020, respectivamente para árvores do dossel, progênies e banco), mas

apenas o intervalo de confiança definido para progênies confirma desvios significativos. Da mesma forma, o índice de fixação total na população de progênies é significativamente diferente de zero e maior do que as estimativas obtidas para as populações de árvores do dossel e do banco (0,249, -0,140 e 0,026, respectivamente) (Figura 1).

Quanto à diversidade genética entre as subpopulações, as estimativas indicaram divergência genética insignificante no estádio de árvores do dossel e significativamente diferente de zero para as sementes do solo (0,039 e 0,045, respectivamente). Já a divergência verificada entre progênies (0,384) está acima da esperada entre progênies de irmãos-completos (0,250).

Tabela 3

Tamanho da amostra (*N*), estimativas médias de heteroziguidade esperada (\hat{H}_e) e observada (\hat{H}_o) e índice de fixação (\hat{f}) obtidos entre as subpopulações de árvores do dossel, progênies e o banco de sementes do solo de *Trema micrantha*, localizadas na RMSG. (Sample size (*N*), mean estimates of expected heterozygosity (\hat{H}_e) and observed (\hat{H}_o) and fixation index (\hat{f}) obtained among subpopulations of adults, tree seeds and soil seeds of *Trema micrantha*, on Santa Genebra Reserve)

	Dossel	Progênies	Banco
<i>N</i>	69 (5)	100 (10)	100 (5)
\hat{H}_o	0,420	0,263	0,404
\hat{H}_e	0,351	0,218	0,394
\hat{f}	- 0,205	- 0,225	- 0,027

Tabela 2

Testes de diferenciação de frequências alélicas entre populações representativas do banco de solo, progênies e árvores do dossel de *Trema micrantha*.

(Differentiation test of allelic frequencies among populations of the soil seeds, tree seeds and adults of *Trema micrantha*)

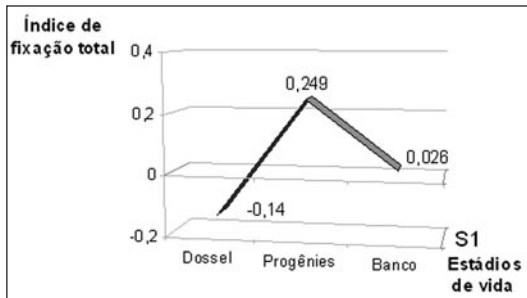
Locos	Banco versus Progênies		Banco versus Dossel		Progênies versus Dossel	
	Probabilidade	Erro padrão	Probabilidade	Erro padrão	Probabilidade	Erro padrão
Got	0,0000	0,0000	0,3129	0,0220	0,0000	0,0000
Dia-2	0,1736	0,0147	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Idh	0,4844	0,0153	0,5211	0,0164	0,4980	0,0094
Gdh-2	0,3583	0,0109	0,6330	0,0050	0,8064	0,0046
Mdh-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Skdh	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Probabilidade média		0,0000		0,0000		0,0000
GL		12		12		12
X-sq		66,4254 **		44,1560 **		81,0529 **

Tabela 4

Índice de fixação médio dentro da população (\hat{f}), índice de fixação total na população (\hat{F}) e diversidade genética entre subpopulações ($\hat{\theta}_p$) das populações representando as árvores do dossel, progênie e o banco de sementes do solo de *Trema micrantha*, localizadas na RMSG.

(Fixation index mean within the population (\hat{f}), fixation index for the specie (\hat{F}) and genetic diversity among subpopulations ($\hat{\theta}_p$), for populations of adults, tree seeds and soil seeds of *Trema micrantha*, on Santa Genebra Reserve)

	Dossel	Progênie	Banco
\hat{f}	- 0,186 (-0,441 a 0,078)	- 0,231 (-0,298 a -0,130)	- 0,020 (-0,163 a 0,138)
\hat{F}	- 0,140 (-0,321 a 0,087)	0,249 (0,146 a 0,348)	0,026 (-0,060 a 0,144)
$\hat{\theta}_p$	0,039 (-0,010 a 0,084)	0,384 (0,326 a 0,446)	0,045 (0,005 a 0,091)

**Figura 1**

Varição do Índice de fixação total na população entre os diferentes estádios de vida avaliados.

(Variation of the fixation index in population between different life stages evaluated)

DISCUSSÃO

As estimativas de diversidade genética foram altas e apresentaram diferenças entre os diferentes estádios de vida analisados. A população de árvores do dossel apresentou tendência a manter maior heterozigosidade do que o banco de sementes e as progênie. As estimativas de heterozigosidade esperada foram menores do que as observadas, resultando em valores negativos para os coeficientes de endogamia média intrapopulacional (Tabelas 3 e 4). Uma maior proporção de heterozigotos para a população de árvores adultas em relação a outros estádios do ciclo de vida já foi encontrado para outras espécies (Schaal e Levin, 1976; El-Kassaby et al., 1987; O'Malley et al., 1988; Eguiarte et al., 1992; Hamrick et al., 1993; Tonsor et al., 1993; Conte, 2001). Tal con-

dição é normalmente associada à competição entre os descendentes nas fases de plântula, muda e juvenil. A condição de alta diversidade com excesso de heterozigotos pode ser relacionada à ação de seleção, favorecendo a manutenção de genótipos heterozigotos atuando já no processo de germinação das sementes. Kalisz (1989) confirmou a associação da maior porcentagem de germinação entre heterozigotos em relação aos homozigotos, quando trabalhou com espécies de plantas anuais.

Variações nas estimativas dos parâmetros de diversidade e estruturação genética salientam a associação dos heterozigotos com o vigor de germinação e permanência das plântulas nesta população de *T. micrantha*. Primeiro, verifica-se um aumento na heterozigosidade observada nas subpopulações do banco de sementes comparativamente às progênie. A esta, pode se acrescentar a drástica redução na estimativa do índice de fixação total verificada novamente entre as fases de progênie e banco de sementes, indicando diminuição da endogamia total na população. Por último, pode-se considerar a manutenção das altas proporções de heterozigosidade observada e o aumento dos desvios em relação à esperada, verificados nas subpopulações de árvores do dossel em relação àquelas do banco de sementes.

A população analisada como banco de sementes são plântulas resultantes da germinação das sementes existentes nas amostras da superfície de solo. Deve-se considerar que estas podem ter

sido submetidas a um processo de seleção natural sendo excluída parte dos indivíduos endogâmicos ou menos vigorosos. Sob este aspecto, as progênies foram germinadas sob condições controladas de temperatura e fototropismo sendo, posteriormente, levadas para desenvolvimento em casa de vegetação. Mesmo as progênies tendo sido obtidas sob condições ambientais mais favoráveis para a germinação do que aquelas do banco de sementes, existiu grande mortalidade entre as plântulas da população de progênies, passando possivelmente a contribuir para o aumento na proporção de heterozigotos nesta população.

Diante das considerações, a permanência das sementes no banco de solo pode ser considerada um fator chave na reposição da diversidade genética da população de plântulas. No entanto, os poucos resultados sobre o assunto demonstraram que o tempo de permanência das sementes no solo não é tão longo. *Cecropia obtusifolia*, por exemplo, possui um banco de sementes com uma razão de renovação de 1,07 anos, sendo que, enquanto a grande maioria das suas sementes conta com uma média de vida de sete dias, algumas podem alcançar muito mais idade (Alvarez-Buylla e García-Barrios, 1991). Para esta espécie, considerou-se muito pouco provável que as sementes mantidas no solo ficassem o tempo suficiente para diminuir a divergência genética entre clareiras, dado que a taxa de renovação da espécie é muito rápida e muito poucas sementes são capazes de permanecer no solo de um ano para o outro (Alvarez-Buylla et al., 1996). *Plantago lanceolata* é uma espécie herbácea com dormência de sementes e também foi estudada quanto a variações na estrutura genética em diferentes fases de vida. Os resultados não demonstraram diferenças significativas entre as estimativas para as sementes do solo em relação às plântulas (Tonsor et al., 1993). Para esta espécie a longevidade de suas sementes também é desconhecida.

As sementes de *T. micrantha* permanecem no solo na forma de diásporos, sendo o pericarpo espesso, garantindo proteção das suas sementes até mesmo contra patógenos (Torres, 1996). Os diásporos são bastante impermeáveis e podem ser armazenados por longos períodos sem

perder o potencial de germinação. Não existem informações quanto à viabilidade dos mesmos em condições de solo, mas seu período de permanência e sua taxa de renovação no banco devem ser bem maiores do que verificado para a *C. obtusifolia* devido à sensibilidade ao ataque de patógenos desta, quando lançada ao solo. Além disto, os diásporos precisaram ser tratados com ácido sulfúrico concentrado durante 20 minutos, no processo de obtenção das progênies para este estudo, sem que afetasse o potencial de germinação de uma porção considerável dos diásporos iniciais. De qualquer forma, são necessários estudos para se definir a permanência e a taxa de renovação do banco de sementes de *T. micrantha* para ter uma discussão mais embasada.

T. micrantha produz grande quantidade de sementes resultantes de um sistema de cruzamento misto, com significativa frequência de cruzamentos biparentais (Ribas, 2003). Como consequência, ocorre a elevação da proporção de genótipos em homozigose dentro das progênies. Sabendo-se disto, e diante das variações nas estimativas de divergência genética e do alto índice de fixação total para as progênies (Tabela 4), verifica-se que o seu sistema reprodutivo é vulnerável à deriva genética. A ocorrência de deriva está, provavelmente, associada ao assincronismo no florescimento entre as plantas reprodutivas e pela polinização ocorrer principalmente de forma restrita dentro de clareiras (Ribas, 2003). Por outro lado, as variações também demonstram que a espécie conta com um eficiente fluxo gênico via sementes, devido à diminuição da divergência genética entre clareiras do banco, comparativamente à obtida para população de progênies.

O sistema reprodutivo desta espécie é marcado pelo assincronismo no florescimento mantido ao longo do seu período reprodutivo (Torres, 1996), o que resulta em variações nas frequências alélicas do conjunto de pólenes e óvulos entre clareiras. Assim, alelos pouco frequentes na população de árvores do dossel podem ter maior frequência nas progênies se aquelas plantas que possuem tais alelos participaram de forma efetiva no período reprodutivo em questão e vice-versa. Portanto, a variação na diversidade dentro e

divergência genética entre clareiras está intimamente associada à deriva genética. A espécie, no entanto, também pode contar com uma dispersão por maiores distâncias por suas árvores serem freqüentemente encontradas nas bordas de fragmentos e nas florestas secundárias que predominam nas paisagens fragmentadas, estando as árvores mais expostas à ação do vento.

Seus frutos podem cair sob a copa de suas árvores, mas boa parte deles é dispersa por pássaros e animais, os quais podem distribuir os frutos por consideráveis distâncias. O amadurecimento dos frutos ocorre ao longo de várias semanas, o que favorece a visitação de dispersores quase diariamente (Torres, 1996) e estes visitam várias árvores dispostas também em diferentes clareiras. Considerando tais características, o fluxo gênico pode ser considerado eficiente o suficiente para alterar drasticamente a divergência genética verificada entre progênies, da mesma forma como alguns autores sugerem que o modo de dispersão de sementes afeta a estrutura genética espacial (Loveless e Hamrick, 1984; Hamrick et al., 1993).

Como mencionado anteriormente, existe uma tendência para a seleção atuar ao longo dos diferentes estádios do ciclo de vida, sendo ela mais acirrada na fase inicial de regeneração devido à grande competição entre plântulas. No entanto, pode-se acreditar num processo de seleção diferenciada de genótipos, variando com as características microambientais nas diferentes clareiras. Sob tais condições, considera-se que a divergência genética entre as subpopulações de plantas, estando estas restritas às clareiras, tende a variar com a idade da clareira. Tal processo baseia-se no fato das clareiras se tornarem internamente mais homogêneas e seletivas do que quando eram clareiras jovens (Martínéz-Ramos, 1992, citado por Alvarez-Buylla et al., 1996). De qualquer forma, por se ter amostrado clareiras ao acaso, sem considerar a idade das mesmas, a competição e seleção provavelmente permanecem favorecendo a divergência genética entre os grupos de plantas restritos às clareiras, tornando-se cada vez menos densa para as espécies do primeiro estágio sucessional.

A espécie pioneira *C. obtusifolia* também foi estudada quanto à estrutura genética de populações para diferentes estádios de vida (Alvarez-Buylla et al., 1996). Como seus agentes dispersores transportam sementes coletadas da mesma infrutescência, sendo estas normalmente dispersas de forma agregada, os autores encontraram correlações elevadas entre genótipos de plântulas amostradas nas clareiras recentes. Em contraste, entre plantas jovens e adultas verificou-se apenas um pequeno agrupamento de indivíduos genotipicamente aparentados, prevalecendo a distribuição espacial próxima do acaso. Para esta espécie também foi considerado que, em cada geração, muito da estrutura é removida devido à competição individual num espaço limitado pela abertura do dossel e, com a seleção atuando conjuntamente, ocorrem flutuações na distribuição genotípica entre classes de idade (Epperson e Alvarez-Buylla, 1997).

A ocorrência de estrutura em família resultante da dispersão de sementes próxima da árvore mãe é considerada comum entre espécies arbóreas (Libby et al., 1969) e, assim como foi proposto para a *C. obtusifolia* (Epperson e Alvarez-Buylla, 1997), também pode ocorrer para *T. micrantha*. No entanto, os resultados obtidos pelos autores concordaram que a estruturação genética espacial varia com a idade da regeneração, e que os agrupamentos de progênies próximos à planta mãe são submetidos à competição e seleção, resultando numa diminuição dessa estrutura até formar nova população de adultos. Além disso, o fluxo gênico naquela espécie pioneira se mostrou eficiente o bastante para romper a estruturação espacial ao longo das gerações, diminuindo a possibilidade do isolamento por distância sobre repetidas gerações de ciclos de vida.

Esse aspecto pode ser considerado também para *T. micrantha* e explica os altos níveis de diversidade genética esperados em populações de espécies preferencialmente alogâmicas, que são polinizadas pelo vento e possuem sementes dispersas por animais, como citado por Hamrick et al. (1992). Justificando seu ponto de vista, os autores verificaram maiores estimativas de divergência genética entre clareiras para populações

no estágio de plântulas do que juvenil ou adulto. Suas análises revelaram que esta variação foi devida a diferenças no grau de concentração de poucos genótipos específicos dentro de clareiras em relação aos diferentes estádios de vida.

T. micrantha enquadra-se na condição de elevado recrutamento e, enquanto o agrupamento de progênies foi encontrado em espécies arbóreas tropicais, existem poucas evidências de estrutura entre adultos (Epperson e Allard, 1989; Schnabel e Hamrick, 1990; Perry e Knowles, 1991), exceto para as populações de plantas com baixa dispersão de pólen e sementes (Epperson e Clegg, 1986; Schoen e Latta, 1989). Tais resultados, vistos como discrepantes por alguns autores, podem ser explicados simplesmente pela redução do número de indivíduos diante da competição. Com a mesma idéia, Epperson (1992) justifica que a elevada densidade de sementes ou plântulas no estágio inicial de regeneração em relação aos pais favorece altas taxas de correlação genética entre as mudas, mas é esperado que esta diminua bruscamente com o desenvolvimento das plantas, tendendo a ser eliminada.

A população amostrada neste estudo está inserida numa paisagem amplamente urbanizada. Os resultados demonstram que a diversidade genética presente no banco é satisfatória para representar a alta diversidade existente na população do dossel da floresta, expondo a plasticidade da espécie em se estabelecer em condições de paisagem bastante alterada. Dessa forma, a alta diversidade mantida na população justifica a agressividade da espécie *T. micrantha* para colonizar diferentes ambientes ao longo da sua grande área de ocorrência, bem como em projetos de restauração de vegetação sob diferentes condições edafoclimáticas.

CONCLUSÕES

A população de *Trema micrantha* estudada apresenta elevada diversidade genética nos três estádios de vida analisados. No entanto, as árvores do dossel e as sementes do banco de solo mantêm maior diversidade genética estando bem distribuída nas clareiras.

Os agentes dispersores de sementes e a permanência de sementes no banco do solo são os prováveis responsáveis pela drástica redução na estruturação genética presente na população de progênies, sendo eles fundamentais na distribuição da diversidade genética sobre grandes áreas de ocorrência.

Diferenças entre os estádios de vida estudados, sugerem forte seleção favorecendo a manutenção de alta diversidade na população de árvores do dossel e redução da endogamia presente em grandes proporções na população de progênies.

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

- 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.; CHAOS, A.; PIÑERO, D.; GARAY, A.A. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. **Evolution**, v.50, n.3, p.1155-1166, 1996.
- 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.; GARCÍA-BARRIOS, R. Seed and forest dynamics: a theoretical framework and an example from the Neotropics. **The American naturalistic**, v.137, p.133-154, 1991.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 640p.
- CLAYTON, J.W.; TRETIAK, D.N. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoreses. **Journal of the fisheries research board of Canada**, v.29, p.1169-72, 1972.
- COHEN, D. Optimizing reproduction in a randomly varying environment. **Journal of theoretical biology**, v.12, p.119-129, 1966.
- CONTE, R. **Genética do cruzamento de plantas em uma população natural do palmeiteiro (*Euterpe edulis* Mart.)**. Florianópolis, 2001. 104p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina
- DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M.B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M.A.O.; BAITELLO, J.B. **Sementes e mudas de árvores tropicais**. 2.ed. São Paulo: Instituto Florestal, CINP, SMA, JICA, 2002. 65p.
- EGUIARTE, L.E.; PÉREZ, N.N.; PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*: implications for evolution and conservation. **Heredity**, v.69, p.217-228, 1992.
- EL-KASSABY, Y.A.; MEAGHER, M.D.; PARKINSON, J.; PORTLOCK, F.T. Allozyme inheritance, heterozygosity and outcrossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith, British Columbia. **Heredity**, v.58, p.173-181, 1987.
- EPPELSON, B.K. Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. **New Forests**, v.6, p.257-278, 1992.
- EPPELSON, B.K.; ALLARD, R.W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within population of lodgepole pine. **Genetics**, v.121, p.369-377, 1989.
- EPPELSON, B.K.; ALVAREZ-BUYLLA, E.R. Limited seed dispersal and a genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. **Evolution**, v.51, n.1, p.275-282, 1997.
- EPPELSON, B.K.; CLEGG, M.T. Spatial autocorrelation analysis of flower color polymorphisms within substructure populations of morning glory (*Ipomoea purpurea*). **The American naturalistic**, v.128, p.840-858, 1986.
- HAKIM-ELAHI, A. **Temporal changes in population structure of the slender wild oat (*Avena barbata*) as measured by allozyme polymorphisms**. Davis, 1980. 124p. Tese (Doutorado). University of California
- 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.; MURAWSKY, D.A.; NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, v.107/108, p.281-297, 1993.
- HYATT, L.; CASPER, B.B. Seed bank formation during early secondary succession in a temperate deciduous forest. **Journal of ecology**, v.88, p.516-527, 2000.
- KALISZ, S. Fitness consequences of mating system, seed weight and emergence date in a winter annual, *Collinsia verna*. **Evolution**, v.43, p.1263-1272, 1989.
- 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
- LEVIN, D.A. The seed bank as a source of genetic novelty in plants. **The American naturalistic**, v.135, p.563-572, 1990.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data - version 1.0**. <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/2000> (16 jun. 2003)
- LIBBY, W.F.; STETTLER, R.F.; SEITZ, F.W. Forest genetics and forest tree breeding. **Annual review of genetic**, v.3, p.469-494, 1969.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 360p.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual review of ecology systems**, v.15, p.65-95, 1984.
- 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).
- O'MALLEY, D.M.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb & Bonpl.: Lecythidaceae): I - mating system. **Theoretical applicance genetics**, v.76, p.929-936, 1988.
- PAKE, C.E.; VENABLE, D.L. Is coexistence of Sonoran Desert annuals mediated by temporal variability in reproductive success. **Ecology**, v.76, p.246-261, 1995.
- PERRY, D.J.; KNOWLES, P. Spatial genetic structure within three sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) stands. **Heredity**, v.66, p.137-142, 1991.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v.49, p.1280-1283, 1995.
- RIBAS, L.A. **Diversidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de duas espécies arbóreas**. Piracicaba, 2003. 102p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo
- ROHLF, F.J.; SCHNELL, G.D. An investigation of the isolation by distance model. **The American naturalistic**, v.105, p.295-324, 1971.
- SCHAAL, B.A.; LEVIN, D.A. The demographic genetics of *Liatris cylindracea* Michx. (Compositae). **The American naturalistic**, v.110, p.191-206, 1976.
- SCHNABEL, A.; HAMRICK, J.L. Organization of genetic diversity within and among populations of *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). **American journal of botany**, v.77, p.1060-1069, 1990.

- SCHOEN, D.J.; LATTA, R.G. Spatial autocorrelation of genotypes in populations of *Impatiens pallida* and *Impatiens capensis*. **Heredity**, v.63, p.181-189, 1989.C
- 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.
- TONSOR, S.J.; KALISZ, S.; FISHER, J.; HOLTSFORD, T.P. A life-history based study of population genetic structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata*. **Evolution**, v.47, n.3, p.833-843, 1993.
- TORRES, R.B. **Biologia da reprodução de *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae)**. Campinas, 1996. 140p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas
- TURNER, M.E.; STEPHENS, J.C.; ANDERSON, W.W. Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.79, p.203-207, 1982.
- VENABLE, D.L.; BROWN, J.S. The selective interactions of dispersal, dormancy, and seed size as adaptations for reducing risk in variable environments. **The American naturalist**, v.131, p.360-384, 1988.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Sudderland: Sinauer, 1996. 377p.