

Conseqüências genéticas da regeneração natural de espécies arbóreas em área antrópica, AC, Brasil

Karina Martins^{1,3}, Luciano Arruda Ribas¹, Maria Andréia Moreno² e Lúcia Helena de Oliveira Wadt¹

Recebido em 21/11/2006. Aceito em 29/11/2007

RESUMO – (Conseqüências genéticas da regeneração natural de espécies arbóreas em área antrópica, AC, Brasil). O cedro (*Cedrela odorata* L.) e o ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* Nichols.) são espécies arbóreas tropicais economicamente valiosas e que têm sido ameaçadas pela exploração madeireira predatória e pela fragmentação florestal. Ambas apresentam dispersão anemocórica e regeneram naturalmente em áreas de pastagem. Esse estudo comparou, para as duas espécies, a diversidade genética de indivíduos estabelecidos em pastagem e em floresta. Trinta indivíduos de ipê-amarelo foram genotipados com cinco locos isoenzimáticos e 54 de cedro, com quatro locos microsatélites. A diversidade genética foi elevada nas duas subpopulações. Para ipê-amarelo, a diversidade genética foi maior na pastagem. Para cedro, observou-se perda de alelos na pastagem ($\hat{A} = 11,75$ alelos/loco) em comparação à floresta ($\hat{A} = 14,50$). Além disso, 31% dos alelos de cedro foram exclusivos da floresta. Não houve divergência genética entre as subpopulações de ipê-amarelo, porém, para cedro, houve divergência significativa, embora baixa (2,2%). Os resultados mostraram que, para as duas espécies, a subpopulação da pastagem não passou por um gargalo genético severo. A colonização de áreas antrópicas mostrou-se eficiente, mas há necessidade de fluxo gênico contínuo, por sucessivas gerações, entre as áreas para restabelecer (cedro) e manter (ipê) os níveis de diversidade genética observados na área de vegetação primária.

Palavras-chave: *Cedrela odorata*, *Tabebuia serratifolia*, dispersão de sementes, conectividade, fragmentação

ABSTRACT – (Genetic consequences of tree species natural regeneration in an anthropogenic area, Acre State, Brazil). Spanish cedar (*Cedrela odorata* L.) and Yellow poui (*Tabebuia serratifolia* Nichols.) are economically valuable tropical tree species that have been threatened by predatory logging and by forest fragmentation. Their seeds are wind-dispersed and both the species colonize and grow-up in pastures. This study compared the genetic diversity in a pasture-established population to a forest population. Thirty yellow poui trees were genotyped with five isozyme loci and fifty four spanish cedar trees were genotyped with four microsatellite loci. Genetic diversity was high in both the populations. In yellow poui, genetic diversity was higher in the pasture population. It was observed loss of alleles in cedar pasture population ($\hat{A} = 11,75$ alleles/locus) in relation to the forest population ($\hat{A} = 14,50$). Moreover, 31% of the cedar alleles were private to the forest population. Genetic divergence was null in yellow poui populations, but significant in the cedar ones (2,2%). Pasture populations don't show evidence of severe genetic bottleneck for both the species. Colonization of anthropogenic areas by these species was efficient, but it requires continuous gene flow, through successive generations, in order to restore (for spanish cedar) and maintain (for yellow poui) the levels of genetic diversity observed in the forest population.

Key words: *Cedrela odorata*, *Tabebuia serratifolia*, seed dispersion, connectivity, forest fragmentation

Introdução

Nas últimas décadas, a taxa de conversão de florestas tem sido particularmente elevada nos trópicos. Um relatório da FAO (2000) estima que o desmatamento de florestas tropicais durante a década de 1990 foi de 14,2 milhões de hectares por ano. Embora atualmente as taxas de desmatamento estejam diminuindo, ainda não é possível estabelecer uma tendência constante ao longo do tempo. De todos os países do bioma da Amazônia, apenas o Brasil tem monitorado sistematicamente o desmatamento na região (FAO 2000). Entretanto, são raros estudos realizados na Amazônia brasileira que avaliaram as conseqüências genéticas da fragmentação

em populações de espécies arbóreas desse bioma (mas veja Kageyama *et al.* 2004a). A maioria das pesquisas que utilizou essa abordagem foi conduzida na Costa Rica (Hall *et al.* 1994 a; b, 1996; Aldrich & Hamrick 1998; Gillies *et al.* 1997; 1999; Céspedes *et al.* 2003; Sezen *et al.* 2005) e em Honduras (White *et al.* 1999; 2002). Considerando a conservação genética, a real conectividade entre fragmentos florestais, e também entre esses fragmentos e populações antrópicas, precisa ser avaliada. Apenas com o conhecimento da conectividade genética será possível precisar tanto os riscos de perda de variação genética (Sork & Smouse 2006) como a relevância de áreas antrópicas para conservação de recursos genéticos.

¹ Embrapa Acre Rodovia BR 364, km 14, C. Postal 321, 69908-970 Rio Branco, AC, Brasil

² Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias 11, C. Postal 09, 13418-900 Piracicaba, SP, Brasil

³ Autor para correspondência: karimartins@yahoo.com

Com base em estudos que abordaram o fluxo gênico em paisagens fragmentadas, Sork & Smouse (2006) propuseram dois elementos para avaliar o risco de perda de variação genética em populações antrópicas, (i) o grau de isolamento da população e a (ii) diversidade das fontes de genes que estão chegando. Ou seja, a manutenção da variação genética requer não apenas taxas elevadas de fluxo gênico, mas também os propágulos devem ter sido originados de fontes diversas. Em plantas, o fluxo de genes ocorre via migração de pólen e sementes. Dessa maneira, a conectividade efetiva dependerá da eficiência dos vetores de dispersão de sementes em colonizar novas áreas e a dos vetores de polinização e dispersão de sementes em manter, ao longo do tempo, o fluxo gênico entre a floresta e as populações antrópicas.

Hamrick (2004) considera que as espécies arbóreas tropicais têm se mostrado resilientes à fragmentação, uma vez que, em geral, apresentam níveis elevados de diversidade genética e mecanismos eficientes de fluxo gênico em longas distâncias. Entretanto, a maioria dos estudos sobre fluxo gênico em populações fragmentadas enfocou o fluxo de pólen (p. ex. Aldrich & Hamrick 1998; Gillies *et al.* 1999; White *et al.* 2002; Céspedes *et al.* 2003; e referências em Sork & Smouse 2006), sendo raros os estudos que avaliaram a efetividade do fluxo gênico via sementes em espécies tropicais (Sork & Smouse 2006), especialmente na colonização de ambientes antrópicos. Em estudo com a palmeira *Iriartea* na Costa Rica, Sezen *et al.* (2005) demonstraram que, ao longo da sucessão em florestas secundárias, a dispersão de sementes contribuía mais para o fluxo gênico total que a migração de pólen. Espera-se que alterações nos padrões de fluxo gênico, tanto via pólen como via semente, ocorrerão de acordo com os vetores de fluxo gênico e sua susceptibilidade a alterações antrópicas.

Cedro (*Cedrela odorata* L.) e ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* Nichols.) são espécies arbóreas economicamente importantes da Amazônia que têm tido suas populações diminuídas em decorrência da fragmentação florestal e da exploração madeireira. Ambas são capazes de regenerar naturalmente em ambientes antrópicos, tanto que são observadas populações secundárias em pastagens (Ibrahim & Camargo 2001). Ambas são polinizadas por pequenos insetos e as sementes são dispersas pelo vento. O objetivo desse trabalho foi avaliar, com a utilização da abordagem genética, a eficiência da dispersão de sementes de cedro e ipê-amarelo na colonização de um ambiente antrópico (pastagem).

Material e métodos

Espécies estudadas – O ipê-amarelo, *Tabebuia serratifolia* Nichols. (Bignoniaceae), é uma espécie

arbórea muito utilizada em paisagismo e arborização urbana. É encontrada em praticamente todos os estados do Brasil (Lorenzi 1992) e na Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname, Trinidad & Tobago e Venezuela (Carvalho 2003). É uma planta decídua, heliófita, característica da floresta pluvial densa, sendo também largamente dispersa nas formações secundárias, como capoeiras e capoeirões; predominantemente em solos bem drenados situados nas encostas (Lorenzi 1992). A floração ocorre durante ou logo após a queda completa das folhas, é sincronizada, rápida e anual. No Acre, a floração ocorre entre julho e agosto e a frutificação entre agosto e setembro (Ferreira *et al.* 2004). As flores são hermafroditas e dispostas em inflorescências nas pontas dos ramos. O cálice e a corola, de coloração amarelo-dourada, apresentam estrutura tubular (Lorenzi 1992). As flores atraem abelhas e pássaros, principalmente beija-flores, sendo que os principais polinizadores são as abelhas (Carvalho 2003). O fruto é uma vagem coriácea, deiscente. As sementes numerosas são leves e aladas e a dispersão é por anemocoria (Ferreira *et al.* 2004). Estudo realizado no estado de São Paulo mostrou que o estabelecimento de plântulas em clareiras é cerca de três vezes maior que sob o dossel da vegetação (Amaral *et al.* 1992).

O cedro, *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), é a espécie mais amplamente distribuída e economicamente importante do gênero *Cedrela* com distribuição desde o norte do México (26 °N) até o norte da Argentina (28 °S) (Valera 1997). No Brasil, sua ocorrência estende-se da Amazônia até o Estado de São Paulo (Lorenzi 1998). Embora apresente ampla área de distribuição, a espécie não é muito comum, com ocorrência dispersa na floresta (Valera 1997). É uma espécie arbórea de grande porte que chega a atingir 40 m de altura e 120 cm de diâmetro a altura do peito (Cavers *et al.* 2003a). É heliófita, de crescimento rápido, decídua e ocorre tanto em florestas úmidas como secas, em altitudes de 1.200 m, em solos férteis e bem drenados (Chaplin 1980 citado por Gillies *et al.* 1997; Valera 1997). A espécie é monóica (Cintron 1990) e predominantemente alógama, já que a espécie é protogínica (flores femininas abrem-se antes das masculinas). Floresce no início da estação chuvosa. As pequenas flores branco-esverdeadas estão reunidas em numerosas inflorescências e são polinizadas por insetos (Cintron 1990; James *et al.* 1998). O desenvolvimento do fruto demora de nove a dez meses e os frutos amadurecem durante a estação chuvosa do ano seguinte (Cintron 1990). Assim como em ipê, os frutos são deiscentes e as sementes são leves e aladas, sendo dispersas pelo vento (James *et al.* 1998). Em florestas naturais, logo após o início da estação chuvosa, é comum observar elevada densidade de plântulas próxima a árvores que frutificaram (Cintron 1990). Entretanto, a

mortalidade dessas plântulas é elevada, e quase todas morrem no meio da estação chuvosa. A madeira, de alta qualidade, tem sido utilizada na manufatura de móveis e na construção civil. O elevado valor comercial da madeira tem resultado em superexploração da espécie, sendo que exemplares de boa qualidade são raramente encontrados, exceto em áreas isoladas (Styles & Khosla 1976 citado por Cavers *et al.* 2003b). A espécie é ameaçada tanto por práticas predatórias de exploração madeireira como pela perda de habitat devido à fragmentação. Estudos genéticos realizados na Costa Rica têm indicado que a espécie apresenta estruturação populacional significativa (Gillies *et al.* 1997; Cavers *et al.* 2003a).

Área de estudo e amostragem – Foram selecionadas duas áreas de amostragem no município de Rio Branco, AC; sendo uma floresta primária contínua (1151,99 ha), na Reserva Florestal do Catuaba, e uma pastagem adjacente à floresta contínua. A Reserva Florestal do Catuaba (UTM 19 L 650768,28; 8885780,18 SAD1969), de propriedade da Universidade Federal do Acre, embora seja uma área de floresta primária, encontra-se fragmentada devido à conversão em áreas de agropecuária e à rodovia BR 364, entretanto não se configura como um fragmento isolado, já que mantém conexão com florestas adjacentes. A área de pastagem está localizada a 5 km da área de floresta e apresenta cerca de 30 anos de idade. Foram identificados, plaqueteados e georreferenciados todos os indivíduos adultos de cedro e ipê-amarelo presentes em uma área de cerca de 56 ha na floresta e uma de 19 ha na pastagem. Foram considerados adultos os indivíduos que apresentaram sinais de florescimento. A diferença na área amostral entre os dois ambientes foi devida à menor densidade populacional das espécies na área da floresta. Buscou-se amostrar número semelhante de indivíduos nos dois ambientes. Foram coletadas amostras foliares de 30 indivíduos de ipê-amarelo (15 na floresta e 15 na pastagem) e de 54 indivíduos de cedro (26 na floresta e 28 na pastagem). Os indivíduos da pastagem foram originados por colonização via sementes, ou seja, não são remanescentes da floresta original. Devido à pequena distância entre as áreas amostradas, ambas foram consideradas como subpopulações de uma população original.

Procedimento laboratorial – As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ-USP em Piracicaba, SP. As subpopulações de ipê-amarelo foram estudadas por meio de marcadores isoenzimáticos e as de cedro foram estudadas com uso de marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos para *Cedrela fissillis*. As amostras foliares de ipê-amarelo foram submetidas à extração de isoenzimas utilizando-se o

tampão de extração Alfenas I completo (com PVPP e β -mercaptoetanol) (Alfenas *et al.* 1991). Os wicks embebidos com os extratos resultantes da maceração das folhas foram armazenados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise da atividade enzimática por meio de eletroforese em gel de amido. Foram testados dois sistemas tampão gel/eletrodo (sistemas 08 e 25 de Alfenas *et al.* 1991), e a revelação por sete sistemas enzimáticos: fosfoglucomutase (PGM EC 5.4.2.2), fosfogluco isomerase (PGI EC 5.3.1.9), peroxidase (PO EC 1.11.1.7), malato desidrogenase (MDH EC 1.1.1.37), α -esterase (α -EST EC 3.1.1.1), isocitrato desidrogenase (IDH EC 1.1.1.42) e shikamato desidrogenase (SKDH EC 1.1.1.25). Todos os sistemas apresentaram atividade enzimática, porém, o padrão de resolução obtido para as enzimas PGM, SKDH e α -EST não foi satisfatório para posterior interpretação. A extração do DNA genômico total das amostras foliares de cedro foi realizada seguindo o protocolo CTAB descrito por Doyle & Doyle (1990). Para a seleção dos locos microssatélites, foram testados oito pares de iniciadores desenvolvidos para *Cedrela fissillis* (Prof. Flávio Gandara, dados não publicados). São eles: CF26; CF34; CF37; CF63; CF64; CF66; CF75; CF83. Após otimização das condições de amplificação em *C. odorata*, os iniciadores que geraram fragmentos passíveis de interpretação e, portanto, selecionados para o presente estudo foram CF34, CF66 e CF75. O par de iniciadores CF66 amplifica dois locos, CF66A e CF66B, logo, os indivíduos de *C. odorata* foram genotipados com quatro locos microssatélites. O coquetel (13 μl) para a realização da PCR foi composto por 15,0 ng de DNA genômico, 250 μM de dNTPs, 0,5 μM de MgCl_2 , tampão para PCR 1X (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl_2 , pH 8,3), 2,5 $\mu\text{g ml}$ de BSA, 0,2 μM de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria). As amplificações foram realizadas em termociclador do tipo MJ Research PTC-100 utilizando o seguinte protocolo: 96 $^{\circ}\text{C}$ por 2'; 30 ciclos de 94 $^{\circ}\text{C}$ por 1', temperatura de hibridação específica de cada par de iniciadores por 1', 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1' e terminando com 72 $^{\circ}\text{C}$ por 7'. Para os três pares de iniciadores, a temperatura de hibridação utilizada foi 54 $^{\circ}\text{C}$. Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel desnaturante de poli(acrilamida a 4% (Uréia 7 M; Tris 93 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM; 5,35M acrilamida; 0,13M bisacrilamida; TEMED 4,4 M; persulfato de amônio 10% - 50 $\mu\text{l ml}$ de gel), em corrida de uma hora em tampão TBE 1X em cuba vertical. Os fragmentos foram observados na forma de bandas, após coloração com nitrato de prata, seguindo o protocolo Creste *et al.* (2001). O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10-pb "ladder" - Invitrogen®).

Fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

Análise estatística – Com os genótipos dos indivíduos das duas subpopulações, obteve-se as estimativas médias de número médio de alelos por loco (\hat{A}), número efetivo de alelos por loco (\hat{A}_e), heterozigosidade observada (\hat{H}_o), diversidade gênica (\hat{H}_e) e índice de fixação (\hat{f}). O intervalo de confiança a 99% do \hat{f} foi obtido por 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos. A aderência das frequências alélicas às proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testada por meio do teste exato de Fisher, como descrito em Weir (1996). O desequilíbrio genotípico entre pares de locos foi avaliado por meio do teste exato de Fisher. Por esse procedimento, genótipos de dois locos são associados diversas vezes e a estatística é recalculada no novo conjunto de dados. Qualquer associação encontrada entre as frequências gênicas em locos diferentes é geralmente denominada como desequilíbrio de ligação, mesmo quando as associações não são decorrentes de ligação entre os locos (Weir 1996). Para locos nucleares, pressupõe-se que os locos são independentes e, portanto, a associação entre pares de locos não é esperada. Com o objetivo de comparar a diversidade genética das duas espécies, as quais foram estudadas com marcadores moleculares com diferentes níveis de polimorfismo, estimou-se a máxima diversidade genética possível ($h_{máx}$) em relação ao número de alelos observados, obtido pela fórmula ($h_{máx} = (\hat{A}-1)/\hat{A}$). A magnitude da diversidade gênica foi quantificada por meio da comparação entre a diversidade gênica estimada (\hat{H}_e) e a máxima diversidade possível em cada loco ($h_{máx}$). Determinou-se o número de alelos privados (\hat{A}_p) a cada subpopulação. A estrutura genética foi avaliada por meio da análise de variância das frequências alélicas, de acordo com Weir & Cockerham (1984). Foram estimados o índice de fixação dentro de subpopulação (\hat{f}), o coeficiente de endogamia da população total (\hat{F}) e a divergência genética entre

subpopulações ($\hat{\Theta}_p$). O intervalo de confiança dessas estimativas foi obtido por meio de 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do software GDA (Lewis & Zaykin 2000).

Resultados

Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) – Com exceção do sistema MDH, que apresentou dois locos (Mdh-1 e Mdh-2), os demais sistemas tiveram apenas um loco (Idh-1, Pgi-2 e Po-3). O loco Po-3 apresentou dois alelos e os demais três alelos por loco (Tab. 1). Na subpopulação da pastagem, as probabilidades do teste exato de Fisher mostraram desvios significativos (a 1%) nas proporções esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg em quatro dos cinco locos (Mdh-1; Mdh-2; Pgi-2, Po-3). Na subpopulação da floresta, por outro lado, as frequências genotípicas observadas estavam próximas do produto das frequências alélicas, em todos os locos. O teste de desequilíbrio genotípico entre pares de locos mostrou associação significativa a 99% entre os locos Idh-1 e Po-3 nas duas subpopulações; entre os locos Pgi-2 e Po-3 na população da pastagem e entre os locos Mdh-1 e Idh-1 na subpopulação da floresta. Como discutido em Weir (1996), em geral as associações entre genes de locos diferentes em indivíduos diplóides (desequilíbrio genotípico) são muito pequenas.

O número médio de alelos por loco ($\hat{A} = 2,80$) não diferiu entre as duas subpopulações, no entanto, as estimativas de número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = 2,61$) e diversidade gênica ($\hat{H}_e = 0,600$) foram maiores na subpopulação da pastagem ($\hat{A}_e = 2,18$ e $\hat{H}_e = 0,504$). Esses resultados indicam que há maior homogeneidade nas frequências alélicas e um aumento de diversidade na pastagem em relação à floresta. Provavelmente, não houve uma amostragem restrita de alelos devido à fragmentação. A maior diversidade

Tabela 1. Genética descritiva dos cinco locos isoenzimáticos utilizados em *Tabebuia serratifolia* e dos quatro locos microsatélites utilizados em *Cedrela odorata*. n: número de indivíduos amostrados; \hat{A} : número de alelos; amplitude alélica em pares de bases, para os locos microsatélites, \hat{H}_e : diversidade gênica; \hat{H}_o : heterozigosidade observada e \hat{f} : índice de fixação.

	Loco	n	\hat{A}	Amplitude alélica (pb)	\hat{H}_e	\hat{H}_o	\hat{f}
<i>T. serratifolia</i>	MDH-1	30	3	-	0,620	0,500	0,196
	MDH-2	29	3	-	0,532	0,172	0,680
	IDH-1	28	3	-	0,665	0,857	-0,295
	PGL-2	30	3	-	0,657	0,333	0,497
	PO-3	27	2	-	0,425	0,148	0,655
<i>Cedrela odorata</i>	CF34	51	16	134-144	0,918	0,941	-0,025
	CF66A	45	5	204-234	0,646	0,111	0,829
	CF66B	53	26	110-178	0,955	1,000	-0,047
	CF78	53	18	116-158	0,923	0,962	-0,043

genética na pastagem é comprovada pela proporção da máxima diversidade possível ($\hat{H}_e/h_{m\acute{a}x}$). Nessa subpopulação, a diversidade encontrada representou 94,8% da máxima diversidade possível, enquanto que na floresta, representou apenas 64,7% (Tab. 2). Todos os alelos detectados na subpopulação da floresta foram observados na pastagem.

Em ambas as subpopulações, a estimativa de \hat{H}_o foi menor que \hat{H}_e , indicando que há um excesso de indivíduos homocigóticos em relação ao esperado pelas proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Os desvios nas proporções do EHW na subpopulação da pastagem foram detectados pelo teste exato. Embora a estimativa de \hat{f} na pastagem (\hat{f} 0,361) tenha sido o dobro da observada na floresta (\hat{f} = 0,178), os intervalos de confiança incluem o zero e se sobrepõem, mostrando que não há diferenças significativas.

Observou-se elevada variação entre locos nos parâmetros de estrutura genética (Tab. 3). As maiores estimativas de índices de fixação foram observadas nos locos Mdh-2 (\hat{f} = 0,603; \hat{F} = 0,729) e Po-3 (\hat{f} = 0,663; \hat{F} = 0,649) e as menores, no loco Idh-1 (\hat{f} = -0,290; \hat{F} = -0,300). Devido à variação entre locos, embora as estimativas médias tenham sido elevadas (\hat{f} = 0,279; \hat{F} = 0,336), as mesmas não diferiram de zero e os intervalos de confiança foram amplos (Tab. 3). O mesmo foi observado com relação à divergência genética entre as subpopulações. Nesse caso, o intervalo de confiança foi amplo devido à estimativa elevada do loco Mdh-2 ($\hat{\theta}_p$ = 0,317). A estimativa média de $\hat{\theta}_p$ = 0,079 não diferiu de zero, indicando que a subpopulação da pastagem foi colonizada por propágulos vindos da subpopulação da floresta.

Cedro (Cedrela odorata) – Os quatro locos microsatélites foram polimórficos, com número observado de alelos

por loco entre cinco (no loco CF66A) e 26 (no loco CF66B) (Tab. 1). Tanto o número médio (\hat{A}) quanto o número efetivo (\hat{A}_e) de alelos na subpopulação da floresta (\hat{A} = 14,50; \hat{A}_e = 12,43) foram superiores ao observado na pastagem (\hat{A} = 11,75; \hat{A}_e = 10,04). Essa diferença, entretanto, não é significativa já que os erros-padrão das estimativas se sobrepõem (Tab. 2). Embora o número de alelos e a diversidade gênica tenham sido sensivelmente maiores na subpopulação da floresta (\hat{H}_e = 0,866) em relação à pastagem (\hat{H}_e = 0,834), a proporção da máxima diversidade genética possível ($\hat{H}_e/h_{m\acute{a}x}$) foi ligeiramente maior na subpopulação da pastagem. A maior proporção da máxima diversidade foi decorrente da maior homogeneidade nas frequências alélicas na pastagem, indicando que alelos raros presentes na floresta não foram detectados na pastagem.

A indicação de perda de alelos raros na pastagem é corroborada pela análise dos alelos privados (\hat{A}_p). Do total de 58 alelos observados na floresta, 18 foram privados a essa subpopulação (31%), ou seja, não foram observados na pastagem (Tab. 2). A maioria dos alelos exclusivos era de ocorrência rara, já que apenas quatro deles apresentavam frequências superiores a 10%. Esse resultado mostra um efeito de amostragem de alelos da floresta para a pastagem, indicando que a subpopulação da pastagem passou por um gargalo genético e poderão ocorrer, nas próximas gerações, mudanças nas frequências alélicas em consequência da deriva genética. Também foram observados sete alelos privados na subpopulação da pastagem (15% do total de 47 alelos), indicando que propágulos vindos de outras áreas de floresta colonizaram esse ambiente.

A diversidade gênica (\hat{H}_e) foi elevada em ambas as subpopulações (Tab. 2), como esperado para marcadores microsatélites. Considerando a média das subpopulações

Tabela 2. Estimativas médias de parâmetros de diversidade para as subpopulações de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e cedro (*Cedrela odorata*). Número médio de indivíduos genotipados (n); número médio de alelos/loco (\hat{A}); número efetivo de alelos/loco (\hat{A}_e); número de alelos privados (\hat{A}_p); magnitude da diversidade gênica ($\hat{H}_e/h_{m\acute{a}x}$); diversidade gênica (\hat{H}_e) e heterozigiosidade observada (\hat{H}_o). Erros-padrão das estimativas entre parênteses. Índice de fixação (\hat{f}) e respectivo intervalo de confiança a 99% (IC_{99%}) obtido por 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos.

		\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{A}_p	$\hat{H}_e/h_{m\acute{a}x}$	\hat{H}_e	\hat{H}_o	\hat{f} (IC _{99%})
<i>Tabebuia serratifolia</i>	Pastagem	2,80 (0,20)	2,61 (0,26)	–	94,8%	0,600 (0,043)	0,389 (0,146)	0,361 (-0,073 a 0,785)
	Floresta	2,80 (0,20)	2,18 (0,31)	–	64,7%	0,504 (0,067)	0,417 (0,131)	0,178 (-0,239 a 0,424)
	Média	2,80 (0,00)	2,40 (0,22)	–	–	0,552 (0,048)	0,403 (0,014)	0,270
<i>Cedrela odorata</i>	Pastagem	11,75 (3,29)	10,04 (3,10)	7	96,5%	0,834 (0,069)	0,736 (0,194)	0,120 (-0,053 a 0,568)
	Floresta	14,50 (2,98)	12,43 (2,90)	18	95,0%	0,866 (0,062)	0,773 (0,190)	0,107 (-0,067 a 0,516)
	Média	13,12 (1,38)	11,24 (1,20)	–	–	0,850 (0,016)	0,755 (0,019)	0,113

Tabela 3. Estimativas de parâmetros de estrutura genética de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*), obtidas com cinco locos isoenzimáticos e de cedro (*Cedrela odorata*), obtidas com quatro locos microssatélites. Índice de fixação dentro de subpopulações (\hat{f}), índice de fixação para a população como um todo (\hat{F}) e divergência genética entre subpopulações ($\hat{\theta}_p$). Intervalo de confiança a 99% (IC_{99%}) obtido por 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos.

	Loco	\hat{f}	\hat{F}	$\hat{\theta}_p$
<i>Tabebuia serratifolia</i>	Mdh-1	0,183	0,208	0,030
	Mdh-2	0,603	0,729	0,317
	Idh-1	-0,290	-0,300	-0,008
	Pgi-2	0,479	0,512	0,063
	Po-3	0,663	0,649	-0,042
	Média	0,279	0,336	0,079
	IC _{99%}	-0,134 a 0,627	-0,102 a 0,704	-0,022 a 0,255
<i>Cedrela odorata</i>	CF34	-0,038	-0,012	0,025
	CF66A	0,814	0,817	0,021
	CF66B	-0,059	-0,036	0,021
	CF78	0,054	-0,031	0,022
	Média	0,114	0,134	0,022
	IC _{99%}	-0,058 a 0,541	-0,035 a 0,551	0,021 a 0,024

pulações, a heterozigiosidade observada ($\hat{H}_o=0,755$) foi sensivelmente inferior à diversidade gênica ($\hat{H}_e=0,850$). Essa diferença, entretanto, foi decorrente da baixa estimativa de \hat{H}_o no loco CF66A (0,136 na floresta e 0,087 na pastagem), cujo teste exato demonstrou desvios significativos a 99% nas proporções de Hardy-Weinberg. Nos demais locos, as estimativas de \hat{H}_o foram sensivelmente superiores a \hat{H}_e , ao contrário do que foi observado em ipê-amarelo. Como conseqüência, o índice de fixação para as duas subpopulações não diferiu significativamente de zero. O teste de desequilíbrio genotípico entre pares de locos mostrou associação significativa a 99% entre as os locos CF34 e CF78, na subpopulação da pastagem.

A estimativa de divergência genética entre as duas subpopulações ($\hat{\theta}_p=0,022$) foi baixa, porém significativa (Tab. 3). Embora a divergência tenha sido baixa (2,2%), vale ressaltar que as subpopulações estão separadas por uma distância de apenas 5 km. Tanto a endogamia total ($\hat{F}=0,134$) quanto a intrapopulacional ($\hat{f}=0,114$), não foram significativas. Como discutido anteriormente, as estimativas elevadas foram decorrentes do valor observado no loco CF66A (Tab. 3).

Discussão

A diversidade genética foi elevada nas duas subpopulações de cedro e de ipê-amarelo como esperado para espécies que se reproduzem predominantemente por polinização cruzada. Em geral, as estimativas de diversidade genética foram superiores ao que tem sido observado em populações de outras espécies arbóreas tropicais estudadas na Costa Rica; como o mogno, *Swietenia macrophylla* (Gillies *et al.* 1999; Céspedes

et al. 2003); e a andiroba, *Carapa guianensis* (Hall *et al.* 1994b). Populações de cedro, *Cedrela odorata*, na Costa Rica, também exibiram menores níveis de diversidade genética que o constatado no presente estudo (Gillies *et al.* 1997; Cavers *et al.* 2003).

Apesar de cedro e ipê-amarelo terem sido estudadas com marcadores moleculares que apresentam níveis de polimorfismo diferentes, a proporção da máxima diversidade possível ($\hat{H}_e/H_{máx}$) mostrou-se elevada em ambas as espécies. Diferentemente do esperado, em ipê-amarelo, a subpopulação da floresta foi a que apresentou menor diversidade genética (apenas 64,7% da máxima diversidade possível). Na subpopulação da pastagem e nas duas subpopulações de cedro, essa proporção ficou em torno de 95%.

Para ipê-amarelo, as estimativas de praticamente todos os parâmetros de diversidade genética foram sensivelmente maiores na pastagem. Já para o cedro, observou-se perda de diversidade genética na pastagem, porém essa não foi significativa. Embora esses resultados indiquem que o mecanismo de dispersão de sementes pelo vento é eficiente na colonização de áreas antrópicas, é necessário ter cautela na interpretação dos dados. Apesar de não ter sido detectada redução de diversidade genética em ipê amarelo, observou-se desvios significativos das proporções esperadas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na pastagem em praticamente todos os locos. Os desvios podem ser resultantes do efeito de amostragem, uma vez que para essa espécie foi estudado menor número de indivíduos. Embora o número médio de alelos tenha sido semelhante nas duas subpopulações, o número efetivo de alelos por loco foi maior na pastagem. Essa diferença mostra que estão ocorrendo mudanças nas frequências dos alelos na pastagem em relação à

floresta. Essa mudança é devida, provavelmente, à deriva genética conseqüente de diferenças no sucesso reprodutivo das árvores maternas cujas sementes colonizaram a pastagem. Torna-se necessário estudar essas subpopulações com marcadores mais polimórficos e amostrar áreas mais extensas de floresta para obter conclusões mais precisas a respeito de diferenças na contribuição de árvores maternas para a colonização da pastagem.

As subpopulações de ipê amarelo foram estudadas com marcadores isoenzimáticos que, devido ao menor nível de polimorfismo, são menos eficientes para avaliar a perda de diversidade genética. Os marcadores microssatélites, por outro lado, apresentam maior número de alelos, sendo que, em geral, boa parte desses ocorre em baixa frequência nas populações. Como os alelos raros são mais susceptíveis à perda por efeito da amostragem, deduz-se que o número de alelos por loco (\hat{A}) e o número de alelos privados (\hat{A}_p) constituem os parâmetros mais indicados para avaliar a perda de diversidade genética (Spencer *et al.* 2000). Como observado em cedro, esses foram os parâmetros cujas estimativas mais variaram entre as subpopulações, indicando a perda de diversidade genética na pastagem.

Uma perda imediata na diversidade gênica (\hat{H}_e), por outro lado, apenas será evidente se o tamanho populacional for drasticamente reduzido (Frankel & Soulé 1981; White *et al.* 1999). Isso porque sua estimativa considera não só a quantidade de alelos na população como a frequência relativa de cada um, sendo mais afetada por alelos que ocorrem em média frequência. Desse modo, os alelos de baixa frequência, os quais são os mais rapidamente perdidos em conseqüência da redução no tamanho populacional, têm uma pequena contribuição à estimativa (Taggart *et al.* 1990).

Nesse estudo, não foi possível obter conclusões precisas sobre a ocorrência de endogamia, devido à ampla variação entre locos nas estimativas de heterozigosidade, provavelmente decorrentes do pequeno tamanho amostral e do baixo número de locos utilizados. Em ambas as espécies a endogamia foi elevada, mas não significativa, uma vez que os intervalos de confiança foram amplos. A divergência genética somente foi significativa entre as subpopulações de cedro (2,2%). Em ipê amarelo, embora a estimativa tenha apresentado maior valor (7,9%), esta não diferiu estatisticamente de zero. As estimativas de divergência genética, entretanto, devem ser interpretadas com cautela, devido ao número restrito de populações estudadas. Entretanto, considerando a pequena distância geográfica entre as subpopulações de cedro, uma divergência de 2,2% torna-se uma estimativa considerável. Do ponto de vista genético, se há divergência significativa entre os indivíduos amostrados nos dois ambientes, os mesmos não constituem uma única população panmítica. Dessa maneira, os grupos de

indivíduos desses dois ambientes não podem ser considerados como subpopulações. Estudos de divergência genética entre populações de *Cedrela odorata* na Costa Rica têm mostrado que a espécie costuma apresentar forte estruturação genética (Cavers *et al.* 2003a; b).

Os resultados desse estudo mostraram que as subpopulações da pastagem não passaram por um gargalo genético forte, e que a dispersão de sementes não foi severamente afetada pela fragmentação. A probabilidade dos padrões de fluxo gênico serem mantidos após a fragmentação dependerá da habilidade da espécie em dispersar seus propágulos através da matriz entre os fragmentos. As espécies com dispersão anemocórica são menos afetadas pela fragmentação do que as zoocóricas (Young & Boyle 2000). As áreas abertas possibilitam que as correntes de ar carreguem as sementes por distâncias mais longas, sendo que a habilidade em manter os padrões de fluxo gênico pode ser apenas uma função simples da distância entre os fragmentos (Young & Boyle 2000). Nesse caso, o sucesso na colonização de ambientes antrópicos dependerá principalmente da capacidade da semente em germinar em pleno sol e do estabelecimento da plântula. Estudos de germinação e regeneração em áreas antrópicas têm mostrado que o cedro (Griscom *et al.* 2005) e o ipê amarelo (Amaral *et al.* 1992) colonizam e se desenvolvem relativamente bem nesses ambientes.

A tendência de maior fluxo gênico após a fragmentação já foi observada em estudo de fluxo de pólen da espécie *Acer saccharum*, a qual é polinizada pelo vento (Young *et al.* 1993). Maior fluxo gênico em populações fragmentadas também foi observado em *Cedrela fissilis*, em um estudo na Floresta Atlântica (Kageyama *et al.* 2004b). Em espécies dispersas pela fauna, por outro lado, a chance das sementes colonizarem áreas abertas dependerá, primeiramente, da capacidade dos animais dispersores atravessarem um ambiente não florestado, que, geralmente, apresenta menor biomassa e complexidade estrutural que a floresta (Young & Boyle 2000).

Mesmo considerando a amostragem restrita do presente estudo, para as duas espécies, as áreas antrópicas se mostraram úteis na conservação dos recursos genéticos. Entretanto, como também constatado por Sezen *et al.* (2005) para uma espécie de palmeira, os resultados deste trabalho sugerem a necessidade de fluxo gênico contínuo, por sucessivas gerações, entre a pastagem e as áreas florestadas para restabelecer (no caso do cedro) e manter (no caso do ipê) os níveis de diversidade genética observados na área de vegetação primária. É necessário ainda avaliar a conectividade genética atual dessas populações, por meio da avaliação da diversidade genética em indivíduos regenerantes na pastagem e de estimativas de fluxo gênico atual. Com essas informações será possível precisar se as populações

antrópicas estarão conservadas em longo prazo, bem como utilizar estratégias de arborização de pastos como alternativa para a conservação de recursos genéticos dessas espécies.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Elza M. Ferraz e a Flávio Bertin Gandara pelo auxílio nas análises laboratoriais e estatísticas. A pesquisa foi financiada pelo Projeto de Conservação e de Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (Probio), do Ministério do Meio Ambiente e executada com apoio da Embrapa-Acre.

Referências bibliográficas

- Aldrich, P.R. & Hamrick, J.L. 1998. Reproductive dominance of pasture trees in fragmented tropical forest mosaic. **Science** **281**: 103-105.
- Alfenas, A.C.; Peters, I.; Brune, W. & Passador, G.C. 1991. **Elektroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, SIF.
- Amaral, W.A.N.; Borges, K.H. & Melo, S.L.M. 1992. Frutificação, predação de sementes e estabelecimentos de plântulas de *Tabebuia serratifolia*. **Revista do Instituto Florestal** **4**: 298-302.
- Carvalho, P.E.R. 2003. **Espécies arbóreas brasileiras**. v.1. Colombo, Embrapa Florestas.
- Cavers, S.; Navarro, C. & Lowe, A.J. 2003a. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology** **12**: 1451-1460.
- Cavers, S.; Navarro, C. & Lowe, A.J. 2003b. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. **Conservation Genetics** **4**: 571-580.
- Céspedes, M.; Gutierrez, M.V.; Holbrook, N.M. & Rocha, O.J. 2003. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. **Molecular Ecology** **12**: 3201-3212.
- Cintron, B.B. 1990. *Cedrela odorata* L. Cedro Hembra, Spanish Cedar, Meliaceae. Mahogany family. Pp. 250-257. In: **Silvics of North America. Hardwoods**. v.2. Washington, DC, Agric. Handbook, USDA.
- Creste, C.; Tulmann Neto, A. & Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter** **19**: 299-306.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.S. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**: 13-15.
- FAO. 2000. **Global forest resources assessment 2000 - Main report**. Forestry paper 140. www.fao.org/forestry/site/fra2000report/en
- Frankel, O.H. & Soulé, M.E. 1981. **Conservation and evolution**. Cambridge, U.K., Cambridge University Press.
- Ferreira, L.; Chalub, D. & Muxfeldt, R. 2004. **Ipê amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols**. Informativo técnico Rede de Sementes da Amazônia, n.5. Disponível em: <http://www.rsa.ufam.edu.br>
- Gillies, A.C.M.; Cornelius, J.P.; Newton, A.C.; Navarro, C.; Hernández, M. & Wilson, J. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. **Molecular Ecology** **6**: 1133-1145.
- Gillies, A.C.M.; Navarro, C.; Lowell, A.J.; Hernández, M.; Wilson, J. & Cornelius, J.P. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPD. **Heredity** **83**: 722-732.
- Griscom, H.P.; Ashton, P.M.S. & Berlyn, G.P. 2005. Seedling survival and growth of native tree species in pastures: implications for dry tropical forest rehabilitation in central Panama. **Forest Ecology and Management** **218**: 306-318.
- Hamrick, J.L. 2004. Responses of forest trees to global environmental changes. **Forest ecology and management** **197**: 323-335.
- Hall, P.; Chase, M.R. & Bawa, K.S. 1994a. Low genetic variation but high population differentiation in a common tropical forest tree species. **Conservation Biology** **8**: 471-482.
- Hall, P.; Orrell, L.C. & Bawa, K.S. 1994b. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **American Journal of Botany** **81**: 1104-1111.
- Hall, P.; Walker, S. & Bawa, K.S. 1996. Effects of forest fragmentation on diversity and mating system in a tropical tree *Pithecellobium elegans*. **Conservation biology** **10**: 757-768.
- Ibrahim, M. & Camargo J.C. 2001. Cómo aumentar la regeneración de árboles maderables en potreros? **Agroforestería em las Américas** **8**: 35-41.
- James, T.; Vege, S.; Aldrich, P. & Hamrick, J.L. 1998. Mating systems of three tropical dry forest species. **Biotropica** **30**: 587-594.
- Kageyama, P.Y.; Caron, D.; Gandara, F.B.; Martins, K.; Wadt, L.H.O.; Lacerda, C.M.B. de; Boufleuer, N.T.; Ribas, L.A.; Moreno, M.A. & Ferraz, E.M. 2004a. **Genetic and ecological aspects of nonwood forest products exploitation in two western Amazonian settlements**. Pp. 149-165. In: B. Vinceti; W. Amaral & B. Meilleur (orgs.). Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil. Roma, IPGRI.
- Kageyama, P.Y.; Caron, D.; Gandara, F.B. & Santos, J.D. dos. 2004b. **Conservation of Mata Atlântica Forest fragments in the State of São Paulo, Brazil**. Pp.167-185. In: B. Vinceti; W. Amaral & B. Meilleur (orgs.). Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil. Roma, IPGRI.
- Lewis, P.O. & Zaykin, D. 2001. **Genetic Data Analysis**: computer program for the analysis of allelic data. <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html> (9/06/2002).
- Lorenzi, H. 1992. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, Plantarum.
- Lorenzi, H. 1998. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v.2. Nova Odessa, Plantarum.
- Sezen, U.U.; Chazdon, R.L. & Holsinger, K.E. 2005. Genetic consequences of tropical second-growth forest regeneration. **Science** **307**: 1-891.
- Sork, V.L. & Smouse, P.E. 2006. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. **Landscape ecology** **21**: 821-826.
- Spencer, C.C.; Neigel, J.E. & Leberg, P.L. 2000. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. **Molecular Ecology** **9**: 1517-1528.
- Taggart, J.B.; McNally, S.F. & Sharp, P.M. 1990. Genetic variability and differentiation among founder populations of the pitcher plant (*Sarracenia purpurea* L.) in Ireland. **Heredity** **64**: 177-183.
- Valera, F.P. 1997. **Genetic Resources of Swietenia and Cedrela in the Neotropics: Proposals for Coordinated Action**. Forest Resources Division, Forestry Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Young, A.G. & Boyle, T.J. 2000. Forest fragmentation. Pp. 123-134. In: A. Young; D. Boshier & T. Boyle (eds.). **Forest conservation genetics: Principles and practice**. CABI Publishing Wallingford, U.K.
- Young, A.G.; Merriam, H.G. & Warwick, S.I. 1993. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. **Heredity** **71**: 277-289.
- Weir, B.S. 1996. **Genetic data analysis II**. Sunderland, Sinauer Associates.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** **38**: 1358-1370.
- White, G.M.; Boshier, D.H. & Powell, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology** **8**: 1899-1909.
- White, G.M.; Boshier, D.H. & Powell, W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **Proceedings of the National Academy of Science** **99**: 2038-2042.