

## DIVERSIDADE GENÉTICA E TAMANHO EFETIVO DE DUAS POPULAÇÕES DE *Myracrodruon urundeuva* FR. ALL., SOB CONSERVAÇÃO EX SITU<sup>1</sup>

Michele Perez Viegas<sup>2</sup>, Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva<sup>3</sup>, Juliana Prado Moreira<sup>4</sup>, Laila Toniol Cardin<sup>4</sup>, Vânia Cristina Renno Azevedo<sup>5</sup>, Ana Yamaguishi Ciampi<sup>5</sup>, Miguel Luiz Menezes Freitas<sup>6</sup>, Mario Luiz Teixeira de Moraes<sup>4</sup> e Alexandre Magno Sebbenn<sup>7</sup>

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi investigar a diversidade, a estrutura genética e o tamanho efetivo, retido em um banco de germoplasma, de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira), procedentes de Aramina-SP e Selvíria-MS. As populações foram avaliadas a partir da amostragem de 25 progênies de polinização aberta de cada população. De cada progênie, 17 a 20 indivíduos foram amostrados e genotipados para oito locos microssatélites. Os maiores valores para o número total de alelos ( $A_t$ ), número médio de alelos por loco ( $A$ ), número efetivo de alelos ( $A_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) foram detectados na população Selvíria ( $A_t = 105$ ,  $A = 13,13$ ,  $A_e = 3,98$ ,  $H_o = 0,669$  e  $H_e = 0,749$ ), enquanto Aramina teve  $A_t = 94$ ,  $A = 13,75$ ,  $A_e = 3,10$ ,  $H_o = 0,535$  e  $H_e = 0,678$ . A diferenciação nas frequências alélicas das duas populações, com relação ao pólen cruzado (0,159) e do óvulo (0,235), indica que cerca de 84% e 77%, respectivamente, da diversidade genética está dentro das populações. O coeficiente médio de coancestria foi maior (Selvíria  $\Theta = 0,165$ , Aramina  $\Theta = 0,169$ ) e o tamanho efetivo médio das progênies (Selvíria  $N_{e(v)} = 3,04$ , Aramina  $N_{e(v)} = 2,69$ ) foi menor do que o esperado em progênies de populações panmíticas ( $\Theta = 0,125$ ,  $N_{e(v)} = 4$ ). O tamanho efetivo total retido no banco ex situ foi estimado em 67,5 na população Selvíria e 71,1 na população Aramina, valores menores do que o requerido ( $N_e = 150$ ) para a conservação de populações em curto prazo. Entretanto, as duas populações apresentaram alta diversidade genética, o que as qualifica para serem utilizadas em programas de conservação e melhoramento genético da espécie, desde que seja aumentado o tamanho efetivo populacional conservado ex situ.

Palavras-chave: Microssatélites, Espécie arbórea tropical e Endogamia.

### GENETIC DIVERSITY AND EFFECTIVE SIZE IN TWO *Myracrodruon urundeuva* FR. ALL., POPULATION UNDER EX SITU CONSERVATION

**ABSTRACT** – The objective of this study was to investigate genetic diversity, genetic structure and effective size retained in a germplasm bank formed by two populations of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira) from Aramina-SP and Selvíria-MS. The populations were evaluated from the sample of 25 open-pollinated progenies of each population. From each progeny, 17 to 20 individuals were sampled and genotyped for eight microsatellite loci. The greatest values for the total number of alleles ( $A_t$ ), average number of alleles per locus ( $A$ ), effective number of alleles per locus ( $A_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ) were detected in Selvíria population ( $A_t = 105$ ,  $A = 13.13$ ,  $A_e = 3.98$ ,  $H_o = 0.669$  and  $H_e = 0.749$ ) in comparison to Aramina ( $A_t = 94$ ,  $A = 13.75$ ,  $A_e = 3.10$ ,  $H_o = 0.535$  and  $H_e = 0.678$ ). The differentiation in allele frequencies between the two populations for the outcross-pollen (0.159) and ovules (0.235), indicate that about 84% and 77% of genetic diversity was within populations. The average coancestry coefficient was higher (Selvíria

<sup>1</sup> Recebido em 03.02.2009 e aceito para publicação em 20.04.2011

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP, Brasil. E-mail: <michelepvegas@yahoo.com.br>.

<sup>3</sup> Fundação Educacional de Andradina Faculdades Integradas Stella Maris, FEA/FISMA, Brasil. E-mail: <kitty\_petrarolha@yahoo.com.br>.

<sup>4</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/FEIS, Ilha Solteira-SP, Brasil. E-mail: <jjubileu@hotmail.com>, <lailinha\_7@hotmail.com> e <teixeira@agr.feis.unesp.br>.

<sup>5</sup> EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, CENARGEN, Brasil. E-mail: <azevedovcr@cenargen.embrapa.br> e <aciampi@cenargen.embrapa.br>.

<sup>6</sup> Instituto Florestal de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Divisão de Dasonomia - Seção de Melhoramento Florestal. E-mail: <miguellmfreitas@yahoo.com.br>.

<sup>7</sup> Instituto Florestal de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. E-mail: <alexandresebbenn@yahoo.com.br>.



$\Theta = 0.165$ , Aramina  $\Theta = 0.169$ ) and the average effective population size within progenies (Selvária  $N_{e(v)} = 3.04$ , Aramina  $N_{e(v)} = 2.69$ ) was lower than expected in progenies of panmitic populations ( $\Theta = 0.125$ ,  $N_{e(v)} = 4$ ). The total effective population size retained in the ex situ bank was estimated in 67.5 in Selvária population and 71.1 in Aramina population, which values lower than the required ( $N_e = 150$ ) for short terms population conservation. However, the two populations showed high genetic diversity, which qualifies them for use in conservation and breeding programs of the species, provided the ex situ conserved population effective size is increased.

**Keywords:** Inbreeding, Microsatellites and Tropical tree species

## 1. INTRODUÇÃO

A conservação de espécies florestais deve ser conduzida preferencialmente *in situ*, permitindo assim a dinâmica natural das populações, e conseqüentemente a sua evolução (FERNANDEZ; MARTINEZ, 2009). Entretanto, quando o ambiente natural tem suas relações ecológicas comprometidas por ações antrópicas, ou por outros fatores, é prudente que também se utilize a conservação *ex situ*, promovendo assim maior garantia da sobrevivência das populações (PINTO et al., 2004; SEGARRA-MORAGUES et al., 2005).

Perturbações antrópicas têm levado à fragmentação de populações naturais de espécies florestais, gerando um risco real de erosão genética e até mesmo de extinção de espécies, especialmente nos biomas tropicais (PINTO et al., 2004). Quando a floresta se torna fragmentada, há uma diminuição no tamanho das populações e conseqüentemente na sua diversidade genética, tornando-as isoladas e vulneráveis a eventos ambientais, demográficos e genéticos, causando reduções. A diversidade genética é fundamental para a sustentabilidade das espécies, pois fornece matéria-prima para a adaptação, evolução e sobrevivência de populações arbóreas (RAJORA; MOSSELLER, 2001). Entretanto, perturbação antrópica pode levar à alteração da distribuição da variabilidade genética e gerar estruturação genética espacial nas populações (LACERDA; KAGEYAMA, 2003; MORAES et al., 2005).

A exploração inadequada de populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. vem comprometendo sua capacidade de sobrevivência em habitat natural (FREITAS et al., 2006). Dessa forma, ações que promovam a sua conservação *ex situ*, para manter os níveis de variabilidade genética, são práticas recomendáveis para ampliação e manutenção da variabilidade genética (SEBBENN; ETTORI, 2001).

Esta é uma espécie arbórea tropical dioica (SANTOS, 1987), polinizada por insetos e encontrada na Argentina, Brasil, Bolívia e Paraguai. No Brasil, a espécie naturalmente se distribuíra desde o estado do Ceará até o estado do Paraná, entretanto grande parte desta área encontra-se fragmentada. Como consequência, *M. urundeuva* atualmente é pouco encontrada na região centro-sul do Brasil, especialmente no estado de São Paulo, onde não mais se apresenta em grandes proporções em seu estado silvestre, exceto em reservas estaduais e particulares. Nestas, com frequência, observa-se que a distribuição é do tipo agrupado, em forma de manchas, constituído por menos de cem indivíduos. As manchas são provavelmente resultantes da dispersão das sementes próximas às árvores matrizes, o que gera estruturação genética espacial intrapopulacional (MORAES et al., 2005).

Se forem mantidas pequenas por muitas gerações, essas populações poderão perder variabilidade genética por deriva genética, o que leva à endogamia e desencadeia a depressão endogâmica. Conseqüentemente, haverá reduções na capacidade adaptativa, no vigor, no porte e na produtividade (RITLAND, 1996). Portanto, esta é uma espécie que necessita de conservação, e, para que sejam traçadas estratégias adequadas, deve-se dar ênfase a estudos sobre a biologia reprodutiva, métodos de propagação, estrutura genética, tamanho efetivo populacional e variação genética entre e dentro das populações (KAGEYAMA, 1990; RESENDE, 1999; SEBBENN, 2003).

Estudos prévios avaliaram a diversidade e estrutura genética de outras populações de *M. urundeuva* utilizando marcadores isoenzimáticos (MORAES et al., 2005), RAPD e cpDNA (REIS et al., 2004), AFLP (FREITAS et al., 2005), e microssatélites (CAETANO et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi investigar a diversidade, a estrutura genética e o tamanho efetivo de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* sob conservação *ex situ*. Assim, foram focalizadas as seguintes questões: i) os níveis de diversidade genética nessas populações; ii) a diferenciação genética entre elas; iii) a coancestria média dentro das progênies e o tamanho efetivo retido no banco de conservação *ex situ*; iv) o número necessário de progênies de polinização aberta dessas populações para reter o tamanho efetivo de referência de 150.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras

Foram estudadas progênies de duas populações de *M. urundeuva*, isoladas em fragmentos florestais da região sudeste do Brasil. A primeira, população Aramina-SP, localiza-se em fragmentos florestais isolados entre extensas áreas de plantio de cana-de-açúcar. A segunda população encontra-se na região de Selvíria-MS, dentro da área de exploração pecuária extensiva. Uma população dista da outra cerca de 460 km. Em cada uma, foram eleitas 25 árvores matrizes, das quais foram coletadas sementes para instalação de testes de progênies, em 26 de fevereiro de 1992, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão – FEPE - da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), localizada no Município de Selvíria (MS). Desse teste de progênies para este estudo, foram amostradas 25 progênies de polinização aberta de cada uma das duas populações, e cada progênie foi representada por 17 a 20 plantas, num total de 978 nas duas populações.

### 2.2. Análise dos Microssatélites

Folhas das progênies adultas de *M. urundeuva* foram identificadas, acondicionadas em sílica gel e transportadas até o Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura (LGPS/UNESP), onde se procedeu à extração de DNA pelo protocolo Doyle e Doyle (1990), modificado por Silva et al. (2010). A quantificação e verificação da qualidade do DNA genômico foi realizada em eletroforese com gel de agarose 0,8%, em TEB 1X (Tris 28 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 7 mM, pH 8,3), contendo brometo de etídio (5 mg/mL). As análises dos locos SSR foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal CENARGEN/EMBRAPA, empregando-se oito pares de *primers*

específicos para *M. urundeuva*, desenvolvidos por Caetano et al. (2005) (Auru C072, Auru D094, Auru D167, Auru D282, Auru B209, Auru A392, Auru D200 e Auru E062). O iniciador *forward* de cada loco foi marcado com um fluorocromo específico. O volume final das reações de PCR foi otimizado para 6  $\mu$ L, com 1 ng DNA genômico, 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 200 mM de cada dNTP, e 1X Go Taq Master Mix PROMEGA, 0,33  $\mu$ M de cada iniciador e água MilliQ estéril. As amplificações foram realizadas em termocicladores 9600 e 9700 (*Applied Biosystem*) nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de pareamento dos *primers* por 30 seg, 72°C por 30 seg, e um ciclo final de 72°C por 5 min. Apenas para o par de *primers* D282, o programa de amplificação foi do tipo *touchdown* (um ciclo de 95°C por 5 min, cinco ciclos de 95°C por 45 seg, 68°C por 5 min (-2°C/ciclo), 72°C por 1 min, cinco ciclos de 95°C por 45 seg, 58°C por 2 min (-2°C/ciclo), 72°C por 1 min, 25 ciclos de 95°C por 45 seg, 50°C por 2 min (-2°C/ciclo), 72°C por 1 min, e finalmente um ciclo de 72°C por 5 min).

Os produtos das reações foram diluídos (1  $\mu$ L de reação para 5  $\mu$ L de água estéril autoclavada) para montagem de multiplex com 2 ou 3 amplificadores de locos distintos, sendo 1  $\mu$ L de cada amplificado, 9  $\mu$ L de formamida HiDi, 0,65  $\mu$ L de água estéril autoclavada e 0,35  $\mu$ L do marcador interno fluorescente (ROX) (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001). Os multiplex foram desnaturados, a 94°C, por 5 min, para eletroforese capilar em equipamento ABI Prism 3700 (*Applied Biosystem*). A detecção e a estimativa do tamanho de alelos em pares de bases foram realizadas com o uso do *software* ABI Prism GeneScan versão 3.7 (*Applied Biosystems*). Os valores foram importados para o *software* ABI Prism Genotyper versão 2.0 NT (*Applied Biosystems*) para filtragem dos picos e interpretação do genótipo de cada indivíduo. Os valores alélicos foram ajustados em categorias discretas, com base em quadrados mínimos pelo *software* AlelloBin (IDURY; CARDON, 1997), eliminando o problema de padronização com uso de critérios pessoais.

### 2.3. Análise dos dados

A diversidade genética de cada população foi estimada agrupando todas as progênies. O número total de alelos ( $A$ ), o número médio de alelos ( $A$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e a esperada ( $H_e$ ) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados para

locos e média entre locos. Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação médio entre progênies ( $F$ ) de acordo com o método de Weir e Cockerham (1984). A significância estatística dos valores de  $F$  foi testada por permutação (10.000), utilizando uma correção para *Bonferroni* (95%,  $\alpha=0,05$ ). O erro-padrão dos valores de  $F$  foi estimado por reamostragem *Jackknife* sobre os locos. Todas estas análises foram geradas utilizando o programa FSTAT, versão 2.9.3.2. (GOUDET et al., 2002). Adicionalmente, foi estimado o número efetivo de alelos por loco ( $A_e$ ) usando a expressão  $A_e = 1/(1 - H_e)$ . Os alelos foram também classificados em dois grupos de acordo com suas frequências nas populações: a) alelos privados (ocorrentes em apenas umas das populações) e b) alelos raros ( $p \leq 0,05$ ). As frequências gênicas foram estimadas utilizando-se o programa FSTAT.

Como a amostra utilizada estava estruturada em famílias de polinização aberta, a diferenciação genética entre as populações foi investigada utilizando-se as frequências gênicas estimadas separadamente para óvulos e polens, usando-se o programa MLTR (RITLAND, 2002). Para medir a diferenciação genética entre as populações, foi empregado o método desenvolvido para locos microssatélites por Hedrick (2005), e a estatística  $G'_{ST}$ . A significância estatística dos valores  $G'_{ST}$  foi testada utilizando-se a reamostragem *jackknife* entre os locos.

O tamanho efetivo foi calculado individualmente para cada progênie e para o conjunto das progênies de cada população (estimativa populacional), usando a expressão:

$$\hat{N}_e = 0.5/\Theta \text{ (COCKERHAM, 1969)}$$

em que  $Q$  é o grupo de coancestria (dentro de progênies e para a população total). O coeficiente de coancestria foi calculado entre plantas de mesma e de diferentes progênies, utilizado-se o estimador proposto por J. Nason, descrito em Loiselle et al. (1995) e o programa SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS 2002). Para esta estimativa, foram utilizadas as frequências alélicas medidas no pólen como representativas das frequências alélicas da população parental. O coeficiente de coancestria esperado dentro de progênies de polinização aberta de espécies dioicas, na ausência de cruzamento entre parentes, é de 0,125 para indivíduos meios-irmãos e de 0,25 para indivíduos irmãos-completos. O coeficiente de coancestria de grupo dentro de progênies foi estimado por:

$$\hat{\Theta}_{xy} = \frac{\sum_{x=1}^{n_f} \sum_{y \neq 1}^{n_f} \hat{\theta}_{xy}}{n^2 - n}$$

em que  $n$  é o número de progênies dentro de cada família,  $\theta_{xy}$  é o coeficiente de coancestria entre os irmãos  $x$  e  $y$  dentro de cada família. O coeficiente de coancestria é uma medida de identidade por descendência dos alelos entre indivíduos. Neste caso, como a referência é uma simples progênie, esta identidade pode ser obtida de duas formas: a) devido apenas aos alelos maternos, no caso de dois meios-irmãos maternos (cruzamento da árvore matriz com dois indivíduos diferentes e não parentes) e b) devido a ambos alelos maternos e paternos, no caso de dois irmãos-completos (cruzamento da árvore matriz com o mesmo pai duas vezes). Assim, o coeficiente de coancestria de grupo estimador em nível populacional foi calculado por:

$$\hat{\Theta} = \frac{\sum_{x=1}^{n_f} \sum_{y \neq 1}^{n_f} \hat{\theta}_{xy} + 2n_{hs}\theta_{hs}}{\sum_{i=1}^m (n^2 - n) + 2n_{hs}}$$

em que  $m$  é o número de famílias dentro de cada população,  $n$  é o número de progênies dentro de cada família;  $n_{hs}$  é o número de meio-irmãos paternos (a mesma árvore doadora de pólen cruzando com mais de uma árvore produtora de semente) entre diferentes famílias.  $\theta_{xy}$  é o coeficiente de coancestria entre os irmãos  $x$  e  $y$  dentro de cada família.  $\theta_{xy}$  é o coeficiente de coancestria entre os meio-irmãos paternos (0,125). Como os marcadores genéticos medem mais identidade por estado alélico do que por descendência, utilizou-se uma restrição para aceitar que dois indivíduos de diferentes famílias fossem meio-irmãos paternos. O valor esperado para o coeficiente de coancestria entre dois meio-irmãos paternos é 0,125, mas somente foram considerados meio-irmãos paternos aqueles indivíduos cujo valor estimado para coeficiente de coancestria foi superior a 0,4. Nesses casos, os valores estimados foram substituídos por 0,125 para serem incluídos nas estimativas de grupo de coancestria.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Diversidade genética

Todos os oito locos analisados foram polimórficos nas duas populações. Para o total de plantas genotipadas, foram observados 118 alelos. O número de alelos variou entre locos de 6 a 27 alelos, com média de 14,5 alelos/loco (Tabela 1). O número efetivo de alelos por locos foi muito menor do que o número de alelos totais por locos, variando entre locos de 2,15 a 6,99, com média de 4,05 alelos efetivos por loco, o que sugere que muitos alelos são raros ( $p \leq 0,05$ ) ou têm baixa frequência ( $0,05 > p > 0,25$ ). A heterozigosidade observada variou entre locos de 0,117 a 0,790, com média de 0,601. A diversidade genética variou de 0,833 a 0,962, com média de 0,912.

**Tabela 1** – Estimativa de parâmetros genéticos em oito locos microssatélites para 978 indivíduos de duas populações de *Myracrodruon urundeuva*.  $A$  é o número de alelos por loco;  $A_e$  é o número efetivo de alelos por loco;  $H_o$  é a heterozigiosidade observada;  $H_e$  é a heterozigiosidade esperada.

**Table 1** – Estimates of genetic parameters in eight microsatellite loci for 978 individuals from two populations of *Myracrodruon urundeuva*. - number of alleles per locus, - effective number of alleles per locus, - observed heterozygosity, - expected heterozygosity.

Locos	$A$	$A_e$	$H_o$	$H_e$
C072	24	6,99	0,774	0,857
D094	12	2,67	0,623	0,626
D167	6	2,15	0,117	0,536
D282	27	3,07	0,411	0,674
B209	19	6,53	0,656	0,847
A392	13	4,42	0,790	0,774
D200	10	3,25	0,623	0,692
E062	7	3,34	0,821	0,701
Média	14,75	4,05	0,601	0,713

Embora as amostras em cada população tivessem tamanhos muito similares (Tabela 2), a população Selvíria apresentou 11 alelos a mais que a população Aramina. A população Selvíria também apresentou maior número de alelos exclusivos (23 alelos) em relação à população Aramina (12 alelos). Contudo, em ambas as populações, os alelos exclusivos tinham baixa frequência (variando de 0,025 a 0,001). O número médio de alelos por locos ( $A$ ), o número de alelos efetivo por locos ( $A_e$ ), a heterozigiosidade observada ( $H_o$ ) e a heterozigiosidade esperada ( $H_e$ ) foram sensivelmente maiores na população Selvíria do que em Aramina (Tabela 2). A população Selvíria apresentou também maior número de alelos raros ( $p \leq 0,05$ ) que a Aramina, 73 alelos (69,5%) contra 60 (63,8%).

O índice de fixação foi positivo e relativamente alto em ambas as populações, mas não foi significativamente diferente de zero, a julgar pelo intervalo de confiança a 99% de probabilidade (Tabela 2).

### 3.2. Diferenciação genética entre populações

A diferenciação nas frequências alélicas, das duas populações, para o pólen cruzado foi de 15,9%, indicando que aproximadamente 84% da diversidade genética está dentro das populações (Tabela 3); para os óvulos (0,235) foi maior que a medida para o pólen, indicando também que cerca de 77% da diversidade genética está dentro de populações. A julgar pelo intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade, ambas as estimativas de diferenciação foram significativamente diferentes de zero.

### 3.3. Tamanho efetivo populacional

O coeficiente de coancestria dentro das progênies foi maior que o esperado em progênies de meios-irmãos (0,125) em todas as progênies de ambas as populações, variando de 0,140 a 0,214 na população Aramina (média

**Tabela 2** – Estimativa de índices de diversidade genética para duas populações de *Myracrodruon urundeuva*. ( $n$ ) é o número de indivíduos analisados; ( $A$ ) é o número total de alelos; ( $A$ ) é o número médio de alelos por loco; ( $A_e$ ) é o número efetivo de alelos por loco; ( $A_{excl}$ ) é o número de alelos exclusivos; ( $A_r$ ) é o número de alelos raros; ( $H_o$ ) é a heterozigiosidade observada; ( $H_e$ ) é a heterozigiosidade esperada; ( $F$ ) é o índice de fixação.

**Table 2** – Estimates of genetic diversity indices in two populations of *Myracrodruon urundeuva*.  $n$  - number of individuals analyzed,  $A_t$  - total number of alleles,  $A$  - average number of alleles per locus,  $A_e$  - effective number of alleles per locus,  $A_{excl}$  - number of unique alleles,  $A_r$  - number of rare alleles,  $H_o$  - observed heterozygosity,  $H_e$  - expected heterozygosity,  $F$  - fixation index.

Parâmetros	Populações	
	Aramina	Selvíria
$n$	492	486
$A_t$	94	105
$A$	11,75	13,13
$A_e$	3,105	3,98
$A_{excl}$	12	23
$A_r$	60	73
$H_o$	0,535	0,669

IC: Intervalo de confiança a 99% de probabilidade, com 10 mil reamostragens *bootstrap* sobre os locos.

**Tabela 3** – Estimativa de diversidade genéticas e estatística  $G'_{ST}$  de Hedrick (2005) para o pólen e os óvulos de *Myracrodruon urundeuva*.**Table 3** – Estimates of genetic diversity and Hedrick statistics (2005) for pollen and ovules of *Myracrodruon urundeuva*.

Loco	Pólen			Óvulos		
	$H_s$	$H_T$	$G'_{ST}$	$H_s$	$H_T$	$G'_{ST}$
<b>D167</b>	0,437	0,496	0,305	0,481	0,611	0,608
<b>E062</b>	0,641	0,663	0,153	0,488	0,488	0,001
<b>D094</b>	0,624	0,636	0,081	0,460	0,484	0,135
<b>D200</b>	0,727	0,733	0,057	0,624	0,679	0,350
<b>A392</b>	0,810	0,817	0,082	0,652	0,668	0,112
<b>B209</b>	0,871	0,882	0,181	0,795	0,808	0,145
<b>C072</b>	0,891	0,897	0,111	0,814	0,833	0,231
<b>D282</b>	0,900	0,914	0,305	0,881	0,898	0,300
<b>Média</b>	0,738	0,755	0,159	0,649	0,684	0,235
<b>IC-sup (95%)</b>	0,783	0,797	0,187	0,696	0,727	0,288
<b>IC-inf (95%)</b>	0,692	0,713	0,132	0,603	0,640	0,183

Intervalo de confiança a 95% de probabilidade, calculado por reamostragem *Jackknife* sobre locos.

de 0,169) e de 0,137 a 0,210 na população Selvíria (média de 0,165). Por sua vez, o tamanho efetivo de cada progênie foi igualmente menor do que o esperado em progênies de populações panmíticas (4), variando de 2,14 a 3,57 na população Aramina (média de 2,96) e de 2,38 a 3,64 em Selvíria (média de 3,04). Já o coeficiente de coancestria de cada população (considera as coancestrias dentro de progênies mais as coancestrias de meio-irmãos paternos) foi de 0,007029 na população Aramina e 0,007412 em Selvíria. O tamanho efetivo total da população Aramina foi estimado em 71,13 e o de Selvíria em 67,46 (Tabela 4).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Diversidade genética

As duas populações estudadas de *M. urundeuva* apresentaram um número maior de alelos do que tem sido observado em estudos com a espécie. O número total de alelos (118) observado em *M. urundeuva*, nas populações de Aramina e Selvíria, foi superior ao observado por Caetano et al. (2005) (72 alelos) em populações do Paraguai e da Argentina. Entretanto, em trabalho mais recente, Caetano et al. (2008), estudando 1.048 indivíduos de populações distribuídas por toda a América do Sul, observaram um total de 97 alelos com seis marcadores idênticos aos utilizados no trabalho. Quando utilizamos esses marcadores, encontramos nas populações de Aramina e Selvíria

um total de 84 alelos. Esse elevado número de *M. urundeuva* denota a ocorrência de alta diversidade genética.

A população de Selvíria apresenta número superior de alelos ( $A_i = 105$ ) em relação ao de Aramina ( $A_i = 94$ ), o que pressupõe maior diversidade genética naquela população. Esses resultados indicam que a perturbação antrópica sofrida pela população de Aramina e a intensa fragmentação da paisagem para cultivos agrícolas levaram a uma redução de sua base genética e, conseqüentemente, de sua diversidade genética. Deve-se considerar que a coleta de sementes desta população foi realizada em 1991, portanto os resultados aqui apresentados refletem a situação genética da população naquele período. Assim, novos estudos baseados em amostras de progênies são importantes, pois irão refletir a atual situação genética da população. Em curto prazo, pode ter ocorrido deriva genética e, em longo prazo, pode ter aumentado a endogamia, decorrente da maior probabilidade de cruzamento entre indivíduos aparentados.

Neste trabalho, a alta porcentagem de alelos raros encontrados nas populações indica o comprometimento com a perda de diversidade genética, pela atuação de deriva genética. Tal fato é ainda mais acentuado na população de Selvíria, onde o número de alelos raros é aparentemente maior. A porcentagem de alelos perdidos é o melhor indicativo da perda de variabilidade genética em populações advindas de fragmentação.

**Tabela 4** – Estimativa de coeficientes de coancestria ( $\Theta$ ) e tamanho efetivo ( $N_e$ ) para cada progênie e média populacional para duas populações sob conservação em banco de germoplasma de *Myracrodruon urundeuva*.**Table 4** – Estimates of coancestry coefficients ( $\Theta$ ) and effective size ( $N_e$ ) for each progeny and average population for two populations under conservation in the germplasm bank of *Myracrodruon urundeuva*.

Progênie	População Aramina			População Selvíria		
	$n$	$\Theta$	$N_e$	$n$	$\Theta$	$N_e$
1	20	0,168	2,98	18	0,175	2,86
2	20	0,154	3,24	19	0,150	3,33
3	20	0,183	2,74	19	0,137	3,64
4	20	0,154	3,26	20	0,151	3,30
5	20	0,174	2,87	19	0,160	3,13
6	20	0,163	3,06	20	0,152	3,29
7	20	0,185	2,70	20	0,155	3,23
8	18	0,214	2,34	20	0,148	3,38
9	20	0,166	3,02	20	0,145	3,46
10	19	0,163	3,06	19	0,160	3,12
11	20	0,182	2,75	20	0,160	3,13
12	20	0,183	2,73	20	0,156	3,20
13	20	0,151	3,31	19	0,176	2,85
14	20	0,172	2,91	17	0,157	3,18
15	17	0,163	3,08	19	0,209	2,39
16	20	0,197	2,53	19	0,158	3,17
17	19	0,173	2,89	20	0,183	2,73
18	20	0,140	3,57	20	0,210	2,38
19	20	0,140	3,57	19	0,177	2,83
20	20	0,190	2,63	20	0,166	3,01
21	19	0,171	2,92	20	0,162	3,09
22	20	0,163	3,06	19	0,167	2,99
23	20	0,151	3,31	20	0,172	2,91
24	20	0,148	3,37	20	0,157	3,18
25	19	0,168	2,98	20	0,171	2,92
Média_prog	—	0,169	2,96	—	0,165	3,04
Total_pop Esperado	491	0,007029	71,13	486	0,007412	67,46
						100

Assim, embora tenha sido detectada alta diversidade genética nessas populações, há a possibilidade de a deriva genética estar atuando, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive com perda de alelos. A fragmentação e o isolamento dessas populações, em decorrência das atividades antrópicas, podem ser os causadores da perda de alelos. Contudo, faltam estudos sobre o isolamento reprodutivo desses fragmentos.

#### 4.2. Diferenciação genética entre populações

Foi detectada alta diferenciação genética entre as duas populações, tanto a partir do pólen como dos óvulos (Tabela 3). Este resultado era esperado,

considerando a grande distância que separa essas populações (~460 km). A diversidade genética mantida dentro e entre populações ocorre em função de eventos históricos e processos evolutivos recentes (LEE et al., 2002). Espécies típicas de cruzamento geralmente apresentam alta diversidade genética dentro, e pequena entre populações, visto que a divergência genética entre populações é reduzida em função do aumento na taxa de fluxo gênico (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Contudo, populações geográfica e reprodutivamente isoladas entre si, devido à colonização e a dinâmicas populacionais, podem apresentar maior diferenciação genética entre si do que populações próximas e que trocam genes constantemente. Provavelmente, após a fragmentação, a deriva genética atuou nas populações

estudadas, levando-as a diferirem-se. Assim, a grande distância separando essas populações e, conseqüentemente, isolando-as reprodutivamente, somada à deriva genética que cada uma experimenta, pode explicar a alta diferenciação genética observada.

### 4.3. Tamanho efetivo populacional

Em espécies dioicas, o parentesco dentro de progênies de polinização aberta pode ser composto por misturas de meios-irmãos e irmãos-completos, dependendo de como ocorreu a reprodução, se foi aleatória ou correlacionada. Ainda, os valores de coancestria entre parentes podem ser maiores do que o esperado entre dois meios-irmãos (0,125) ou irmãos-completos (0,25), caso tenham sido gerados por cruzamentos entre parentes. O coeficiente de coancestria estimado dentro das progênies foi maior que o esperado em progênies de meio-irmãos em todas as progênies de ambas as populações. Isso indica que muitos dos cruzamentos foram correlacionados ou endogâmicos. A taxa de cruzamentos correlacionada pode ser estimada em espécies dioicas do coeficiente de coancestria médio dentro de progênies, usando a expressão sugerida por Sousa et al. (2005):  $\Theta = 0,125(1+F_p)(1+r_p)$ , em que  $F_p$  é o coeficiente de endogamia na geração parental e  $r_p$  é a correlação de paternidade, a qual mede a proporção de progênies de cruzamentos que são irmãos-completos. Assumindo  $F_p = 0$ , conforme estimativa do índice de fixação em ambas as populações (Tabela 2) e isolando o  $r_p$  na expressão de Sousa et al. (2005) [ $r_p = (\Theta/0,125) - 1$ ], estima-se uma correlação de paternidade de 0,35 e 0,32 nas populações Aramina e Selvíria, respectivamente. Portanto, observa-se que aproximadamente 30% das progênies eram parentes no grau de irmãos-completos. Isso significa que as árvores matrizes de Aramina e Selvíria receberam pólen de poucas árvores doadoras (aproximadamente 2,9 e 3,1 árvores,  $N_{ep} = 1/r_p$ ). Em outros termos: as árvores matrizes dessas populações possuem uma pequena vizinhança reprodutiva.

Considerando as progênies conjuntamente, tem-se que levar em conta o possível parentesco entre plantas de diferentes progênies, pois uma mesma árvore paterna poder ter fertilizado diferentes árvores matrizes simultaneamente, dando origem a meio-irmãos paternos entre progênies. Nas análises dos dados, observou-se baixo coeficiente de coancestria entre plantas nas

populações (<0,007). Isso, em termos teóricos, sugere que uma baixa endogamia poderia ser esperada do cruzamento aleatório no atual banco de germoplasma.

O entendimento da relação entre o tamanho efetivo e o tamanho real de uma população é de fundamental importância para o planejamento de estratégias de conservação. Com cruzamentos perfeitamente aleatórios e com a possibilidade de as progênies amostradas terem recebido pólen de diferentes conjuntos gênicos, o tamanho efetivo deste conjunto de progênies de cada população seria de 100 [ $N_e = 4x(0,5/0,125)$ ], isto é, estas 25 progênies, compostas cada uma por 20 plantas (totalizando 500), representariam 100 plantas não parentes e não endogâmicas. Nesse caso, os tamanhos efetivos das duas populações poderiam ser somados, visto que não ocorreu sobreposição do conjunto gênico compartilhado pelas populações individualmente, devido ao isolamento geográfico. Então, o tamanho efetivo total retido no banco, nesse caso, seria de 200, ou as 1.000 plantas representariam 200 plantas não parentes e não endogâmicas. Contudo, o que se observou foi que os cruzamentos não foram aleatórios (parte foram correlacionados) e ocorreu sobreposição do conjunto gênico compartilhado pelas árvores matrizes dentro das populações. Se cada uma das progênies tivesse recebido pólen de diferentes conjuntos gênicos, os tamanhos efetivos estimados de cada progênie poderiam ser somados, o que resultaria em tamanhos efetivos de 74,9 e 76,7 nas populações Aramina e Selvíria, respectivamente. Contudo, esta estimativa não leva em consideração plantas parentes de diferentes progênies, parentes como meio-irmãos paternos, devido ao cruzamento de um mesmo pai com várias árvores matrizes. Quando isso foi considerado, o tamanho efetivo foi reduzido para 71,1 e 67,5 nas populações Aramina e Selvíria, respectivamente. Portanto, o banco tem um tamanho efetivo total de 138,6, ou seja, as 1.000 plantas representam 139 plantas não parentes e não endogâmicas.

Uma grande utilidade prática da estimativa do tamanho efetivo é estimar o número de árvores matrizes ( $m$ ) para a coleta de sementes (SEBBENN, 2003). O número de matrizes pode ser estimado diretamente do tamanho efetivo que se pretende conservar ou amostrar ( $N_{e(reference)}$ ), dividido pelo tamanho efetivo médio das progênies, ( $m = N_{e(reference)}/N_e$ ) (SEBBENN, 2003). Esta



expressão é baseada em três pressuposições básicas: i) as árvores matrizes onde é feita a coleta das sementes não são parentes entre si; ii) as árvores matrizes não fertilizam entre si; e iii) as árvores matrizes compartilham diferentes conjunto gênicos, ou seja, não há sobreposição no conjunto gênico recebido pelas diferentes árvores (ausência de meios-irmãos paternos). Caso todas estas pressuposições sejam satisfeitas, a expressão sugerida por Sebbenn (2003) é válida. Como *M. urundeuva* é dioica, a pressuposição ii é sempre verdadeira, visto que árvores fêmeas não cruzam umas com as outras. Por outro lado, as outras duas pressuposições são mais difíceis de serem satisfeitas. É necessário que sementes sejam coletadas a grandes distâncias para evitar que as árvores matrizes sejam parentes entre si e para que o seu conjunto gênico polínico não seja sobreposto. Portanto, a mínima distância entre matrizes para a coleta de sementes não pode ser determinada somente com base em informações na estrutura genética espacial das populações, mas também com informações sobre a distância de dispersão de pólen e a área de vizinhança reprodutiva. Este tipo de estudo falta em *M. urundeuva*, bem como na grande maioria das espécies arbóreas. Como exemplo, assumindo que todas as três pressuposições citadas são válidas e que o objetivo é reter uma amostra com um tamanho efetivo de 150, o número médio de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes seria de 51 ( $m = 150/2,96$ ) na população Aramina e de 49 ( $m = 150/3,04$ ) em Selvíria. Contudo, neste estudo, pelo menos a pressuposição iii é sabidamente violada, visto que se detectou sobreposição no conjunto gênico recebido das diferentes árvores matrizes. O número de árvores matrizes pode ser determinado, usando-se uma simples regra de três. Por exemplo, se as sementes de polinização aberta de 25 matrizes representam tamanhos efetivos de 71,1 e 67,5, para ter um tamanho efetivo de 150 na amostra seria necessário coletar sementes de 53 ( $m = N_{e(\text{reference})} \times n_{\text{matrizes}} / N_e = 150 \times 25 / 77,1$ , em que  $n_{\text{matrizes}}$  é o número de árvores matrizes onde foi feita a coleta de sementes) árvores matrizes na população Aramina e de 56 ( $m = 150 \times 25 / 67,5$ ) árvores matrizes na população Selvíria. Portanto, seriam necessárias amostras de mais 28 e 31 árvores matrizes das populações Aramina e Selvíria, respectivamente, para reter o tamanho efetivo de referência de 150 de cada população.

Finalmente, os resultados obtidos nas populações estudadas de *M. urundeuva* mostram que há a possibilidade de utilizá-las em programas de conservação

e melhoramento genético. Por apresentarem uma alta diversidade genética, mais acentuada na população de Selvíria, essas populações podem ser utilizadas em programas de conservação, desde que o tamanho efetivo populacional conservado *ex situ* seja substancialmente aumentado, visto que o parentesco entre e dentro de progênes reduziu o tamanho efetivo das amostras.

## 5. CONCLUSÕES

Embora tenha sido detectada alta diversidade genética nas populações de *Myracrodruon urundeuva* procedentes de Aramina-SP e Selvíria-MS, ocorreu deriva genética no processo de reprodução, o que significa que as frequências dos genes nas progênes mudaram em relação à população parental, inclusive com perda de alelos.

A fragmentação e o isolamento dessas populações em decorrência das atividades antrópicas (pecuária extensiva e cultura da cana-de-açúcar) foram os agentes causais das alterações no sistema de reprodução e diferenciação genética entre as populações. Contudo, faltam estudos sobre o isolamento reprodutivo destes fragmentos.

Os altos coeficientes de coancestria dentro das progênes foram o resultado da deriva genética no processo de reprodução, como evidenciado nos cruzamentos correlacionados e cruzamentos entre parentes.

As árvores matrizes dessas duas populações possuem uma pequena vizinhança reprodutiva, recebendo pólen de poucas árvores doadoras.

Por apresentarem uma alta diversidade genética, em especial em Selvíria, essas populações podem ser utilizadas em programas de conservação, desde que o tamanho efetivo populacional conservado *ex situ* seja substancialmente aumentado, visto que o parentesco entre e dentro de progênes reduziu substancialmente o tamanho efetivo das amostras.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc nº 2007/53518-6 e nº 2005/60113-7); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. nº 470713/2006-2), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (Prodoc. Capes nº 33004099079P1). Aos técnicos

Alexandre Marques Silva, José Cambuim e Alonso Ângelo da Silva, pelo apoio na coleta do material vegetal.

## 7. REFERÊNCIAS

APPLIED BIOSYSTEMS. **Genescan 3.7**. Foster City: Applied Biosystems, 2001. CD ROM.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Genotyper 2.0**. Foster City: Applied Biosystems, 1996. CD ROM.

BRONDANI R. P. V., GRATTAPAGLIA, D. A simple and cost effective method to synthesize a fluorescent labeled internal DNA standard for fragment sizing in an automatic sequencer. **Biotechniques**, v.31, p.793-800, 2001.

CAETANO, S. et al. The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, v.13, n.17, p.3147-3159, 2008.

CAETANO, S. et al. Identification of microsatellite markers in a neotropical seasonally dry Forest tree, *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.21-23, 2005.

COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, n.1, p.72-84, 1969.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.

FERNANDEZ, J.; GONZALEZ-MARTINEZ, E. S. C. Allocating individuals to avoid inbreeding in ex situ conservation plantations: so far, so good. **Conservation Genetics**, v.10, n.1, p.45-57, 2009.

FREITAS, M. L. M. et al. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Por marcador AFLP. **Scientia Florestalis**, v.68, n.1, p.21-28, 2005.

FREITAS, M. L. M. et al. Variação genética em progênies de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão em três sistemas de cultivo. **Revista Árvore**, v.30, n.3, p.319-329, 2006.

GOUDET, J. FSTAT (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. **Journal Heredity**, v.86, p.485-486, 2002.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.618-620, 2002.

HEDRICK, F. A standardized genetic differentiation measured. **Evolution**, v.59, p.1633-1638, 2005.

IDURY, R. M.; CARDON, L. R. A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. **Genome Research**, v.11, p.1104-1109, 1997.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia Florestalis**, n.64, p.108-119, 1990.

LACERDA, C. M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Allemão na região semi-árida, Brasil. **Revista Árvore**, v.27, n.2, p.145-150, 2003.

LEE, S. L. et al. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, v.89, p.447-459, 2002.

LOISELLE, B. A. et al. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v.82, p.1420-1425, 1995.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, n.1, p.65-95, 1984.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas **Revista Árvore**, v.29, n.2, p.281-289, 2005.

- PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffi* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, n.65, p.40-48, 2004.
- RAJORA, O. M.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources **Euphytica**, v.118, n.2, p.197-212, 2001.
- REIS, A. M. M., GRATTAPAGLIA, D. RAPD variation in a germplasm collection of *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae), an endangered tropical tree: Recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.51, p.529-538, 2004.
- RESENDE, M. D. V. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p.589-647.
- RITLAND, K. Inferring the genetic basis of inbreeding depression in plants. **Genome**, v.39, n.1, p.1-8, 1996.
- RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, v. 88, p.221-228, 2002.
- SANTOS, E. **Nossas madeiras**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1987. 316p.
- SEBBENN, A. M.; ETTORI, L. C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênies misto. **Revista do Instituto Florestal**, v.22, n.13, p.201-211, 2001.
- SEBBENN, A. M. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, v.15, p.109-124, 2003.
- SEGARRA-MORAGUES, J. G. et al. On the verge of extinction: genetics of the critically endangered Iberian plant species, *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae) and implications for conservation management. **Molecular Ecology**, v.14, p.969-982, 2005.
- SILVA, C. L. S. P. et al. Um método eficiente de extração de DNA de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) **Cultura Agrônômica**, 19p. (Artigo Submetido - (2010)).
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, n.38, p.1358-1370, 1984.