

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Universidade Federal do Amazonas



FLUXO GÊNICO E DIVERSIDADE GENÉTICA  
EM UMA POPULAÇÃO MANEJADA DE MOGNO  
(*Swietenia macrophylla*, KING - MELIACEAE)  
NA AMAZÔNIA ORIENTAL

THIAGO JOSÉ DE CARVALHO ANDRÉ

Dissertação de Mestrado

Manaus 2005

UFAM – UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INPA – INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS NATURAIS

**FLUXO GÊNICO E DIVERSIDADE GENÉTICA  
EM UMA POPULAÇÃO MANEJADA DE  
MOGNO (*Swietenia macrophylla* King,  
Meliaceae) NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

**THIAGO JOSÉ DE CARVALHO ANDRÉ**

Orientador: Dr. Rogério Gribel

Co-Orientadora: Dra. Maristerra Lemes

Fonte Financiadora do Projeto: Projeto GENE0-TROPECO: “*Sustainable Management of Neo-Tropical Tree Genetic Resources: Combining Molecular and Modelling Methods to understand the Structure and Dynamics of Gene Diversity*” (União Européia).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, pelo convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração **Ecologia**.

Manaus AM

2005

**“Sem ser por nossa culpa, nem por força de qualquer planejamento cósmico ou propósito consciente, nós nos tornamos, graças a uma maravilhosa obra do acaso chamada inteligência, os administradores da continuidade da vida na Terra. Não pedimos para desempenhar esse papel, mas não podemos abjurá-lo”.**

Stephen Jay Gould

## AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos, em Brasília, pelo imenso apoio, em especial pelo carinho e dedicação, que se transformaram no combustível para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e ao projeto Geneo-Tropeco, da União Européia, pelo financiamento da presente dissertação de mestrado.

Ao Dr. Rogério Gribel, pela orientação entusiasmada e pelas conversas enriquecedoras e à Dra. Maristerra Lemes, pelo aprendizado. Conviver com vocês fez muito bem para o meu caráter.

Ao Dr. James Grogan (IMAZON-Belém/PA), pela cooperação, essencial ao trabalho, e pelo convívio no campo e em Belém, sempre gentil e atencioso.

Aos membros da aula de qualificação, Dr. Bruce Nelson, Dra. Maria Teresa Fernandez Piedade e Dra. Isolde Ferraz, aos *referees* do plano de mestrado, Dr. Charles Clement e Dr. William Magnusson, todos do INPA, e aos *referees* da dissertação, Dr. William Laurance (SI), Dr. Milton Kanashiro (EMBRAPA), Dr. Paulo Kageyama (ESALQ/USP) e Dr. Maurício Reis (UFSC) pelas sugestões e acréscimos à qualidade do trabalho.

Ao José Ribeiro, pelo companheirismo e eficiência nas coletas de campo, além claro das ótimas conversas, nas quais aprendi muito. E à equipe de campo do Dr. James Grogan, que fizeram o trabalho de campo em Marajoara prazeroso e educativo.

À Amanda Mortati por iluminar meus dias com seu sorriso largo. Amo muito você.

À Débora Drucker, pelas conversas florestais, ao Milton Bianchini, pelo convívio, à Renata Frederico, pela espontaneidade e à Juliana Stropp, pela amizade e pela ajuda. Foi e tem sido ótimo dividir um lar com vocês!

Às "irmãs": Carla Bantel, Daniela Rossoni, Juliana Leoni e Juliana Schietti, pela maravilhosa amizade, pelo privilégio do convívio e pelo apoio. Aos "irmãos": Jorge Silva e Fabrício Baccaro, pelos momentos mais embaraçosos e mais divertidos desses anos. Sou seu amigo para sempre!

Aos amigos do LABGEN, Alberto Vicentini, Daniel Dutra, Laura Bernardes, Alessandra Pinto, Thieme Martiniano, Paulo Bobrowiec e Thana Esashika. Vocês transformaram momentos de dificuldade em provas de amizade. Muito obrigado por todo o esforço, paciência e aprendizado.

Aos demais companheiros do INPA pela amizade e ajuda! Aos que vão: até a volta; aos que ficam: até sexta!

Obrigado por tudo!

## **FICHA BIBLIOGRÁFICA:**

André, T. 2005

Fluxo gênico e diversidade genética em uma população manejada de mogno (*Swietenia macrophylla*, King – Meliaceae) na Amazônia oriental.

Manaus: INPA/UFAM, 2005.

p. 46

Dissertação de Mestrado

1. Fluxo gênico 2. Diversidade genética 3. Mogno 4. Amazônia.

## **SINOPSE:**

Para quantificar o alcance do fluxo de pólen entre árvores de mogno (*Swietenia macrophylla*), foi realizada uma análise de parentesco de plântulas coletadas em uma população manejada no sudeste do Pará, Amazônia oriental. Foram analisados aspectos da estruturação genética espacial e relacionada à fenologia de floração de *S. macrophylla*. O efeito do corte seletivo sobre a variabilidade genética da população foi quantificado comparando parâmetros genéticos em indivíduos pertencentes a diferentes classes pré- e pós-corte.

Palavras-chaves: fluxo gênico, diversidade genética, mogno, Amazônia.

Keywords: gene flow, genetic diversity, mahogany, Amazonia.

## SUMÁRIO

<b>Lista de figuras .....</b>	<b>i</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>i</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iii</b>
<b>Introdução geral.....</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>Área de estudo.....</b>	<b>7</b>
<b>Métodos moleculares .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 1 - Fluxo gênico e estrutura genética em uma população manejada de mogno (<i>Swietenia macrophylla</i> King – Meliaceae) na Amazônia oriental.....</b>	<b>12</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>Métodos.....</b>	<b>16</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>19</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Diversidade genética em uma população manejada de mogno (<i>Swietenia macrophylla</i> King – Meliaceae) na Amazônia oriental.....</b>	<b>25</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>25</b>
<b>Métodos.....</b>	<b>30</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusões e implicações para o manejo e conservação da espécie ..</b>	<b>37</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>40</b>
<b>Anexo I. Frequências alélicas de adultos e plântulas .....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição de *Swietenia macrophylla* em território brasileiro, evidenciando a área de estudo, no sudeste do estado do Pará..... 2
- Figura 2** – Área de estudo. Projeto de manejo Marajoara, localizado no sudeste do estado do Pará.. ..... 8
- Figura 3** – Sistemas Multiplex mostrando 3 (A) e 2 (B) locos microssatélites analisados simultaneamente em géis de poliacrilamida num sequenciador ABI 377, para 26 amostras de *Swietenia macrophylla*..... 11
- Figura 4** – Distribuição da distância entre os pais identificados na análise de parentesco de plântulas de uma população manejada de *Swietenia macrophylla* na Amazônia oriental.. ..... 19
- Figura 5** – Distribuição da variabilidade genética de indivíduos de *Swietenia macrophylla* em uma população na Amazônia oriental pelo espaço. Correlação entre grau de parentesco e distância espacial em adultos e plântulas. .... 20
- Figura 6** – Distribuição da variabilidade genética de indivíduos de *Swietenia macrophylla* em uma população na Amazônia oriental pelo tempo. Correlação entre grau de parentesco e distância entre dias de início da floração entre 1997 e 2001.....19

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Algumas estimativas da extensão do fluxo de pólen a partir de análise de exclusão de paternidade com marcadores moleculares microssatélites em árvores tropicais... .....14
- Tabela 2** – Diversidade genética ( $A$ =número de alelos;  $H_e$ =heterozigosidade esperada;  $H_o$ =heterozigosidade observada;  $G_o$ =genótipo único) e índice de endocruzamento ( $f$ ) em coortes de uma população manejada de *Swietenia macrophylla* na Amazônia oriental.. .....33

## RESUMO

O mogno, *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), é a espécie florestal com maior valor comercial da região Neotropical e tem sido super explorada ao longo de sua área de distribuição. O presente trabalho investigou os padrões de fluxo de pólen, a estruturação genética e o efeito do corte seletivo na diversidade de uma população manejada de mogno no leste da Amazônia. Foram utilizados oito locos microssatélites hipervariáveis para estimar os parâmetros genéticos analisados, utilizando-se um seqüenciador automático de DNA. A extensão do fluxo de pólen entre árvores da população foi avaliada por meio de análise de parentesco das plântulas. A estruturação genética espacial e temporal foi investigada correlacionando-se o grau de parentesco de pares de árvores pelas distâncias espaciais e pelas distâncias entre o dia de início da floração entre elas. O número de alelos por loco ( $A$ ), a heterozigosidade média ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), o número de genótipos multilocos únicos ( $G_o$ ) e o coeficiente de endocruzamento ( $f$ ) foram estimados para uma geração pós-corte (plântulas) e para a geração pré-corte (adultos) a fim de se quantificar o efeito do corte seletivo sobre a variabilidade genética populacional. A análise de parentesco encontrou os pais envolvidos no cruzamento de 19 das 51 plântulas genotipadas. O fluxo de pólen entre árvores variou entre 0,25 e 2,7 km (média de 1,5 km) na população, uma distância maior do que a esperada quando considerado o sistema de polinização por pequenos insetos. Os dados sugerem que a endogamia deve ser rara na população, devido a ausência de estruturação genética espacial e a baixa sincronia na fenologia da floração entre indivíduos aparentados. Houve uma redução significativa do número de alelos, heterozigosidade observada e genótipos multilocus únicos da geração pré- para a geração pós-corte seletivo. A perda de diversidade genética na população ocorreu provavelmente devido à redução no tamanho efetivo da população, o que causa perda de alelos e limita as possibilidades de cruzamentos, ocasionando um excesso de homozigose nas plântulas em comparação aos adultos. Os dados aqui apresentados confirmam a ocorrência de erosão genética devido ao corte seletivo e levanta questões referentes à conservação genética de populações manejadas de espécies florestais tropicais.

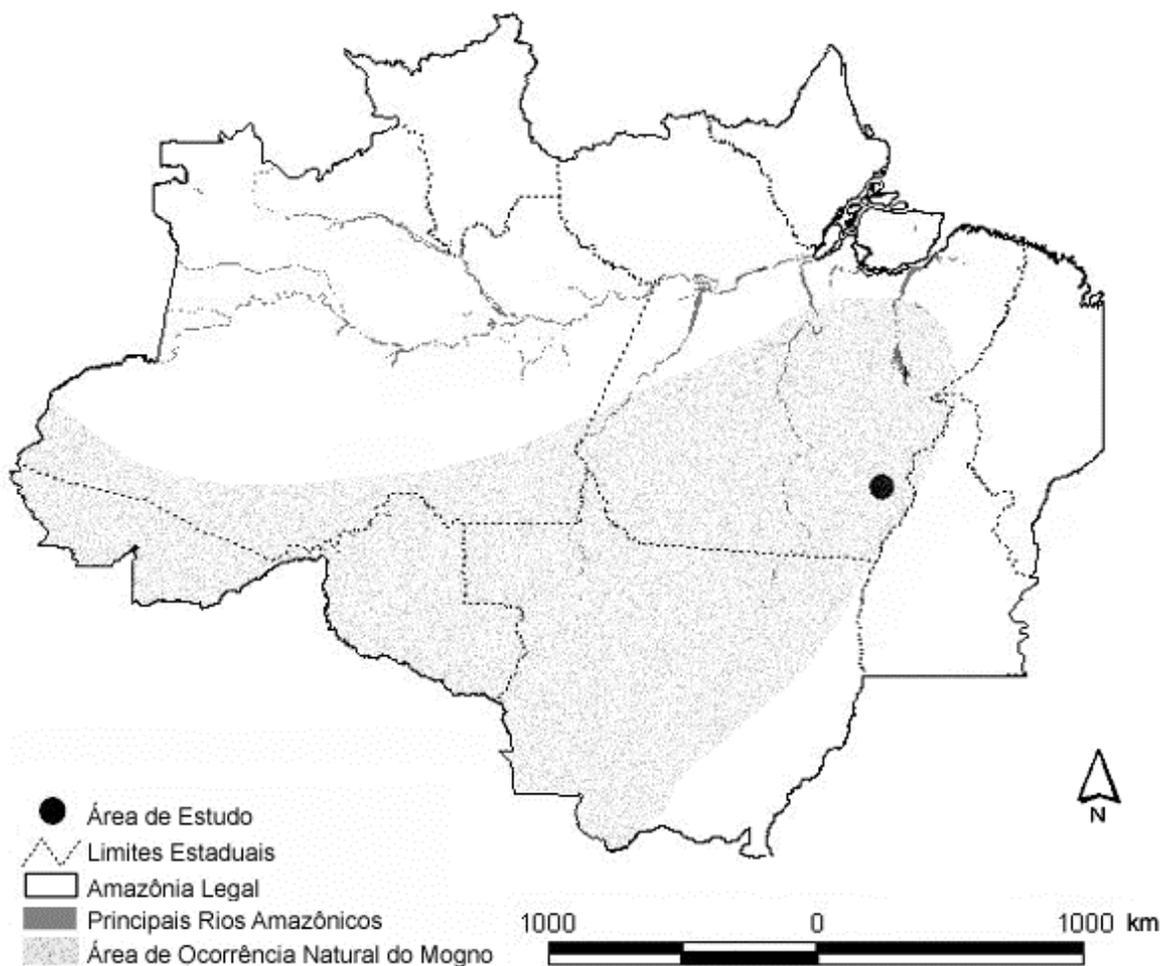
## ABSTRACT

Mahogany, *Swietenia macrophylla*, is the most valuable commercial forest species from the Neotropics and has been over-exploited along its range distribution. The present study investigated the patterns of pollen flow, genetic structure and the effects of selective logging on the genetic diversity of one managed mahogany population in Eastern Amazonia. Eight hypervariable microsatellite loci were used to estimate the genetic parameters using an automated DNA sequencer. The extension of pollen flow between trees in the population was estimated by parentage analysis of seedlings. The spatial and temporal genetic structure of the population was determined correlating the parentage level with the spatial distances and distances between the starting day of flowering between pair of trees. The number of alleles per locus (A), mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) mean observed heterozygosity ( $H_o$ ), the number of unique multilocus genotypes ( $G_o$ ) and the inbreeding coefficient ( $f$ ) were estimated for one post logging generation (seedlings) and the pre logging generation (adults) aiming to quantify the effects of the selective logging on the population genetic variability. Parentage analysis showed parents involved in the outcrossing of 19 out of 51 genotyped seedlings. The pollen flow between trees varied from 0.25 to 2.7 km (mean 1.5 km), a distance greater than expected if considering pollination by small insects. The data suggest rare inbreeding in the population probably due to the lack of spatial genetic structure and low flowering synchrony between related individuals. There was a significant reduction in the number of alleles, observed heterozygosity and unique multilocus genotypes in the post compared to the pre logging generation. The loss of genetic diversity probably occurred owing to the reduction of effective population size, which leads to the loss of alleles and limit possibilities to outcrossing, causing an excess of homozygous in the seedlings compared to the adults. The data presented here confirm the occurrence of genetic erosion in a logged population of mahogany and raised questions related to the conservation genetics of managed populations of tropical forest species.

## INTRODUÇÃO GERAL

O mogno, *Swietenia macrophylla*, é a espécie florestal com maior valor comercial da região Neotropical. O metro cúbico de madeira, com qualidade de exportação em 2001, estava cotado em US\$ 1.200 (Grogan 2001), sendo que a produção brasileira de mogno contribui com aproximadamente 500.000 m<sup>3</sup>/ano (Grogan *et al.* 2002). A super-exploração e a destruição do habitat têm ameaçado seriamente as populações de mogno ao longo de toda sua distribuição, levando à recente inclusão da espécie no Apêndice II da CITES (Convention for International Trade in Endangered Species of the Wild Fauna and Flora), refletindo a preocupação internacional em relação ao futuro da espécie (CITES 2003).

No Brasil, sua distribuição engloba uma área de aproximadamente 1,5 milhão de km<sup>2</sup>, ocorrendo ao longo de um arco ao sul da Amazônia (Figura 1) (Lamb 1966; Barros *et al.* 1992; Grogan *et al.* 2002). Uma árvore adulta de mogno possui 30 a 40 m de altura, podendo atingir até 70 m. Antes mesmo de formar galhos, pode atingir 25 m (Grogan *et al.* 2002). Em florestas nativas, possui uma taxa de incremento diamétrico de 0,49 a 0,79 cm por ano, quando com diâmetro a altura do peito (DAP) maior que 10 cm. *Swietenia macrophylla* regenera-se na maioria dos casos em clareiras (Gullison *et al.* 1996; Grogan *et al.* 2002) e compõe o dossel da floresta primária como emergente. O mogno é uma espécie monóica, suas flores são polinizadas por diversos insetos generalistas, como abelhas e mariposas (Styles 1972), e as sementes são dispersas pelo vento.



**Figura 1.** Distribuição de *Swietenia macrophylla* em território brasileiro, evidenciando a área de estudo, no sudeste do estado do Pará.

A maioria das populações de mogno já sofreu exploração e há evidências de dificuldade de regeneração em áreas perturbadas (Gullison *et al.* 1996). Após a exploração no sul do Pará, Grogan (2001) encontrou uma regeneração rara ou mesmo ausente, e argumentou que isso se deve às condições necessárias para o recrutamento natural de *S. macrophylla* raramente ocorrerem após o corte, como a abundância de sementes e eventos de dispersão a longa distância.

Das aproximadamente 305 espécies madeireiras atualmente exploradas na Amazônia brasileira, 13% estão susceptíveis a uma redução populacional causada pela intensa atividade madeireira (Martini *et al.* 1998). A diminuição da densidade populacional de árvores tropicais sob intensa pressão de exploração, aliada à destruição do habitat, como no caso do mogno, podem acarretar na redução da variabilidade genética, comprometendo a viabilidade das populações e levando muitas delas à extinção local (Bawa 1993; Alvarez-Buylla *et al.* 1996; Lemes *et al.* 2003).

### **Genética da conservação de árvores tropicais: parâmetros genéticos - implicações ecológicas**

Árvores em florestas neotropicais tipicamente ocorrem em densidades de um ou menos indivíduos por hectare (Wright 2002). Uma vez que a maioria dessas árvores demanda fecundação cruzada para produção de sementes (Alvarez-Buylla *et al.* 1996), espera-se que suas populações cubram áreas de centenas de km<sup>2</sup> (Nason 2002; Chase *et al.* 1996; Kaufman *et al.* 1998).

Muitas dessas populações, porém, estão sendo reduzidas pela forte fragmentação do habitat e pelo corte madeireiro. Os efeitos genéticos e ecológicos da provável redução no fluxo gênico das espécies têm sido negligenciados pelos tomadores de decisão.

Cruzamentos restritos, que são gerados por restrições na área de forrageio do polinizador e pela diminuição na densidade de árvores reprodutivas, podem reduzir a viabilidade populacional de árvores tropicais, que já ocorrem naturalmente em baixas densidades (Konuma *et al.* 2000). A

variabilidade genética é essencial para que a adaptação evolutiva a mudanças ambientais possa ocorrer, sendo, portanto, necessária para a manutenção das espécies em longo prazo. A probabilidade de extinção local aumenta com a redução do tamanho da população, uma vez que gera fatores genéticos e evolutivos prejudiciais ao potencial adaptativo populacional. Estes incluem a perda da variabilidade genética, importante para a evolução adaptativa; a fixação aleatória de mutações deletérias; e a perda de alelos, por deriva e erosão genética (Lacy 1986; Alvarez-Buylla *et al.* 1996). Desse modo, estimativas do coeficiente de endocruzamento, estrutura e variabilidade genética são úteis para se avaliar o papel da erosão genética e a perda de variação potencialmente adaptativa em populações naturais afetadas pela redução populacional.

Estudos sobre variabilidade e estrutura genética de populações de *S. macrophylla* mostraram uma considerável variabilidade genética dentro das populações e significativa diferenciação genética entre populações, na Amazônia brasileira e América Central (Lemes *et al.* 2003; Novick *et al.* 2003) com base na análise de marcadores de DNA microssatélites. Em estudo sobre o sistema reprodutivo de *S. macrophylla* na população de Marajoara, no sudeste do Pará, também baseado em análise de microssatélites, Lemes (2000) observou uma taxa de fecundação cruzada de 95%, demonstrando a predominância de sistema reprodutivo alógamo. Em estudo sobre fluxo de pólen numa população fragmentada de *Swietenia humilis* na América Central, utilizando marcadores microssatélites, White *et al.* (2002) detectaram um

extensivo movimento de pólen entre os fragmentos, indicando uma alta resiliência da espécie à perturbação.

Poucos trabalhos até o presente tiveram por objetivo quantificar o efeito genético do corte seletivo (porém ver Projeto DENDROGENE 2005; Oddou-Moratorio *et al.* 2004; Dayanandan *et al.* 1999; Murawski *et al.* 1994; Savolainen & Kärkkäinen 1992), em árvores tropicais, e menos ainda estimaram concomitantemente o fluxo gênico.

O manejo sustentável de recursos madeireiros em florestas tropicais depende do entendimento dos efeitos da prática extrativista na biologia reprodutiva e na manutenção da diversidade genética após o corte (Murawski *et al.* 1994). Os riscos de extinção local em consequência do manejo podem aumentar em espécies de árvores que não só são raras mas que também possuem alto valor comercial, sofrendo, portanto, uma pressão antrópica predatória intensa.

## OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos principais:

(1) Quantificar o alcance do fluxo de pólen entre árvores de *S. macrophylla*, por meio de análise de parentesco de plântulas;

(2) Determinar se há uma estruturação genética espacial ou relacionada à fenologia de floração de *S. macrophylla*;

(3) Avaliar o efeito do corte seletivo sobre a variabilidade genética de uma população manejada de *S. macrophylla*, no sul do Pará, quantificando e comparando parâmetros genéticos em indivíduos pertencentes a diferentes classes etárias, pré- e pós-corte.

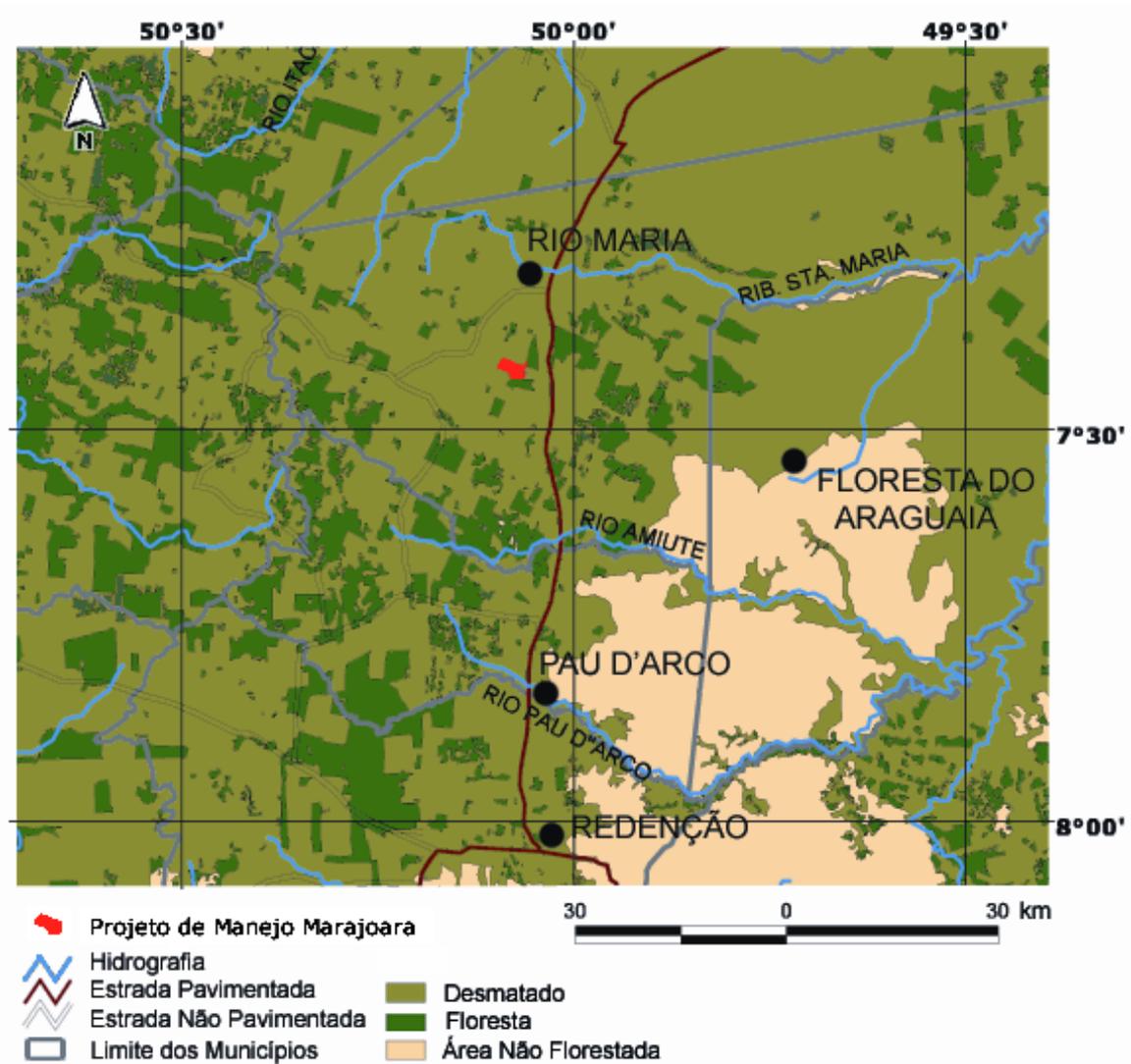
Com isso, espera-se contribuir com informações adicionais a respeito da genética e sistema de acasalamento dessa importante espécie de árvore tropical, fortalecendo a base de conhecimento para a tomada de decisões sobre o manejo florestal genética e ecologicamente sustentável.

## ÁREA DE ESTUDO

O trabalho de campo foi conduzido na área do Projeto de Manejo Marajoara (Figura 2), situado no município de Redenção no sudeste do Pará. O Projeto localiza-se na região brasileira onde se encontram as maiores densidades de mogno (Grogan *et al.* 2002) e onde se encontra também a maior pressão exploratória à esta espécie, no país. O Pará é o maior (64%) fornecedor de mogno para exportação no Brasil (Veríssimo *et al.* 1995). Além disso, existem indicativos de que as populações de mogno presentes nessa região respresentem as populações fundadoras das demais populações da espécie na América do sul (Lemes *et al.* dados não publicados).

O projeto de manejo Marajoara possui uma área total de aproximadamente 4.100 ha. A extração seletiva de mogno na área ocorreu entre 1992-1994 (Grogan 2001). A densidade de mogno na área central de estudo (três parcelas de 3 km<sup>2</sup> cada) foi reduzida de aproximadamente 0,39/ha (uma árvore por cada 2,7 ha) para 0,11/ha (uma árvore por cada 9,4 ha) (Lemes 2000; Grogan 2001).

Grogan (2001) estabeleceu coordenadas cartesianas ( $x,y$ ) para todos os indivíduos acima de 10 cm de DAP, mapeando-os nas três parcelas centrais do projeto, possibilitando a análise espacial conduzida no presente estudo.



**Figura 2.** Área de estudo. Projeto de manejo Marajoara, localizado no sudeste do estado do Pará.

## MÉTODOS MOLECULARES

### Marcadores Moleculares Microssatélites

Microssatélites são seqüências de DNA constituídas de um a seis nucleotídeos de comprimento repetidas em *tandem*, as quais encontram-se ampla e aleatoriamente distribuídas em regiões não-codificadoras dos genomas dos eucariotos (Tautz & Renz 1984; Litt & Luty 1989). Cada seqüência repetitiva constitui um *loco* genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (Powell *et al.* 1996; Morgante & Olivieri 1993; Condit & Hubbell 1991).

Os locos microssatélites, além disso, possuem expressão co-dominante, o que significa que ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados, isso aliado ao multialelismo, caracteriza esta classe de marcadores moleculares como a de mais alto conteúdo de informação de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia 1996). Por suas características, os microssatélites apresentam um alto poder de discriminação individual, o que os torna uma poderosa ferramenta em estudos sobre análise de parentesco, fluxo gênico, estrutura genética populacional e inferências sobre eventos demográficos recentes, incluindo impactos antropogênicos sobre as populações (Rafalski *et al.* 1996; Chase *et al.* 1996; Pearse & Crandall 2004), contribuindo de forma significativa para estudos de ecologia populacional e conservação biológica.

### **Coleta do material e extração do DNA**

Para as análises genéticas foram coletadas folhas de indivíduos de *S. macrophylla* com DAP igual ou superior a 10 cm, as quais foram acondicionadas em sílica gel e estocadas à -20° C para posterior extração do DNA.

O DNA genômico total foi extraído das folhas seguindo o protocolo CTAB de extração de material vegetal (Doyle & Doyle 1987) modificado por Ferreira & Grattapaglia (1996). A quantificação do DNA extraído foi feita por comparação com um DNA padrão de massa molecular conhecida (DNA lambda) em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio.

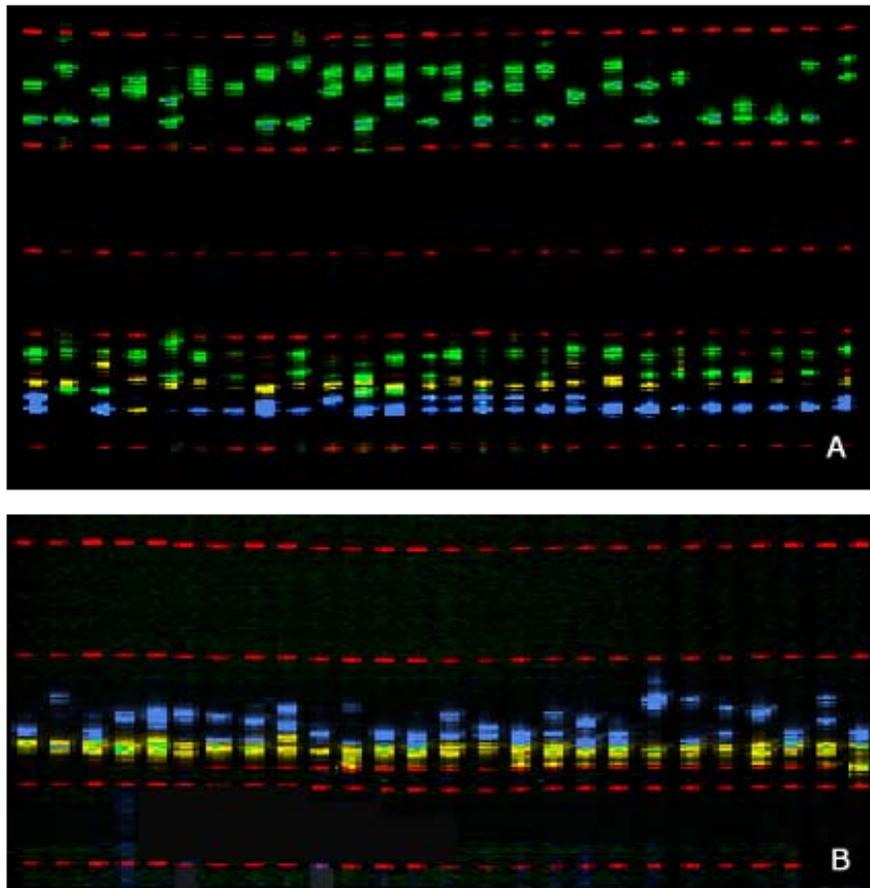
### **Amplificação dos locos microssatélites e genotipagem**

As análises genéticas foram realizadas com base na amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de oito locos microssatélites isolados e caracterizados para *S. macrophylla* por Lemes *et al.* (2002). As reações de amplificação foram realizadas num volume total de 25 µl para reações multiplex (mais de um loco analisado numa mesma PCR) ou 10 µl para reações com um único loco contendo 1,25 - 2,0 µM de cada primer, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada nucleotídeo (dNTP), tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), BSA (2,5 mg/ml), 5,0 ng de DNA e água ultra pura.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador MJ Research nas seguintes condições: (1) desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30

ciclos de: (2) desnaturação a 94°C por 1 min; (3) anelamento à 56°C para os oito pares de primers por 1 min, (4) extensão a 72°C por 1 min, e uma etapa de extensão final a 72°C por 45 min.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram diluídos e adicionados ao padrão interno para estimativa do tamanho dos alelos (ABI GeneScan 500 TAMRA) e tampão de coloração Blue-Dextran. Os produtos amplificados foram então analisados sob eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 5% em um seqüenciador automático de DNA ABI 377 XL (Figura 3). Foram utilizados os programas GeneScan e Genotyper (ABI), respectivamente para coleta e análise dos dados genotípicos.



**Figura 3.** Sistemas Multiplex mostrando 3 (A) e 2 (B) locos microssatélites analisados simultaneamente em géis de poliacrilamida num sequenciador ABI 377, para 26 amostras de *S. macrophylla*.

## CAPÍTULO 1

**FLUXO GÊNICO E ESTRUTURA GENÉTICA EM UMA POPULAÇÃO  
MANEJADA DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* KING –  
MELIACEAE) NA AMAZÔNIA ORIENTAL****INTRODUÇÃO**

Em plantas com sementes, a relação entre estrutura genética e fluxo gênico é complexa pelo fato dos genes poderem se movimentar durante dois estágios, na semente e no pólen (McCauley 1997). Isso porque o pólen e a semente são dispersos de maneiras muito distintas, e em geral por vetores também diferentes, de modo que o deslocamento dos propágulos pode gerar padrões muito variados de dispersão dos genes no espaço e no tempo. Medidas de fluxo gênico em plantas têm sido em geral consideradas sob duas abordagens: estimativas indiretas, que consideram o fluxo gênico geral (semente mais pólen) e são calculadas a partir de parâmetros genéticos sobre a estrutura genética de populações, como, por exemplo, índices de diferenciação genética  $F_{ST}$  e  $G_{ST}$  ou frequência de alelos raros (Slatkin 1985); e as estimativas diretas que determinam o fluxo gênico exclusivamente via pólen ou via semente (Ellstrand 1992a; Ennos 1994).

O fluxo gênico pode variar dentro de uma mesma espécie em relação ao genótipo da planta, ao vetor de dispersão do propágulo, ao tamanho da população, à densidade de adultos florindo e à estação climática (Ellstrand 1992a). Além disso, espera-se que a distância de dispersão do pólen seja

influenciada também pelo sistema sexual e pela síndrome de polinização (Nason 2002). Particularmente problemática é a observação dos movimentos dispersivos de longa distância, tanto de pólen quanto de semente, que são eventos raros representados pela cauda das curvas de distância de dispersão (Austerlitz *et al.* 2004; Ellstrand 1992b).

Um dos importantes fatores influenciando o fluxo gênico é o sistema de cruzamento. Este expressa a maneira como os genes são transmitidos de uma geração para a outra, a partir da relação existente entre o número de sementes formadas por auto-fecundação e o número de sementes geradas por fecundação cruzada (Ritland 1983; Hamrick & Murawski 1991). Tal relação está sujeita a fatores genéticos e ecológicos, como o sistema sexual (monoícia, dioícia, etc.), os mecanismos de auto-incompatibilidade, a fenologia, a disponibilidade de polinizadores e seus modos de forrageio, entre outros (Hamrick & Murawski 1991; Nason 2002).

O estudo do fluxo gênico a partir da estimativa da distância de cruzamento e números de parceiros é fundamental para o entendimento do processo reprodutivo em plantas com fecundação predominantemente cruzada (Konuma *et al.* 2000; Bawa 1993; Ellstrand 1992a). Os trabalhos pioneiros que utilizaram marcadores genéticos para estimar fluxo de pólen em plantas tropicais utilizaram marcadores de isoenzimas (Hamrick & Murawski 1991; Boshier *et al.* 1995; Stacy *et al.* 1990; Nason *et al.* 1998). Mais recentemente, o advento de técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) possibilitou o desenvolvimento e a caracterização de

marcadores de DNA microssatélites para várias espécies de plantas e sua aplicação em estudos genéticos populacionais (Tabela 1).

Tabela 1. Algumas estimativas da extensão do fluxo de pólen a partir de análise de exclusão de paternidade com marcadores moleculares microssatélites em árvores tropicais.

Espécie	Polinizador	Local	Dispersão de Pólen (m) [Média (Máxima)]	Referência
<i>Pithecellobium elegans</i>	mariposas	Costa Rica	142 (350)	Chase <i>et al</i> 1996
<i>Swietenia humillis</i>	pequenos insetos	Honduras	300 (4500)	White <i>et al</i> 2002
<i>Dinizia excelsa</i>	abelhas	Brasil/Amazônia	417 (3200)	Dick 2001
<i>Neobalanocarpus heimii</i>	abelhas	Malásia	194 (664)	Konuma <i>et al</i> 2000

A distribuição espacial da variabilidade genética dentro de uma população de plantas é resultado de vários processos demográficos e genéticos, tais como dispersão de sementes e pólen, densidade de adultos e histórico da colonização. Ao movimentar a informação genética contida nos gametas (pólen) e nos embriões (sementes), o fluxo gênico promove a homogeneização da diversidade genética, a propagação de mutações e a criação de genótipos diferentes, resultados de novas combinações alélicas (Nason 2002; Kaufman *et al.* 1998). Assim, espera-se que espécies que possuem uma estratégia de dispersão a longa distância de seus gametas e propágulos, apresentem estrutura genética com menor diferenciação entre populações locais. O padrão espacial da variabilidade genética também é determinado pelo estágio de vida, especialmente em espécies com ciclos de vida longos, como é o caso das árvores (Oddou-Moratorio *et al.* 2004).

Para espécies com baixas taxas de auto-fecundação, como o mogno (Lemes 2000), o número de parceiros reprodutivos potenciais depende do grau de sincronia de floração entre os indivíduos da população e da habilidade da comunidade de polinizadores de localizar árvores floridas e realizar fluxo de

pólen entre elas. Assim, outra forma de estruturação genética que não a espacial, e que ainda não foi avaliada em sistemas florestais tropicais, é a estruturação genética temporal. Esta se daria caso indivíduos adultos geneticamente relacionados possuam mais dias de floração coincidentes entre si que entre indivíduos não aparentados. O parentesco associado ao estímulo ambiental comum para o início da floração na população, poderia gerar padrões fenológicos mais contíguos entre indivíduos geneticamente relacionados. Isso pode levar a um aumento na taxa de cruzamentos entre indivíduos aparentados (endocruzamento), podendo resultar em erosão genética nas gerações sucessivas.

Assim, este trabalho tem como objetivo quantificar e caracterizar o fluxo de pólen e a estruturação genética, espacial e temporal, em uma população manejada de mogno na Amazônia brasileira.

## MÉTODOS

Para quantificar a amplitude do fluxo de pólen na população, 51 plântulas e 220 indivíduos com DAP acima de 10 cm foram coletados e analisados para oito locos microssatélites desenvolvidos para o mogno por Lemes *et al.* (2002) (ver seção *Métodos Moleculares*). A totalidade de árvores considerada como potenciais pais representa aproximadamente 75% dos adultos presentes na área em 2003.

A análise de parentesco das plântulas foi efetuada com base nas frequências alélicas de oito locos microssatélites por meio do programa CERVUS 2.0 (Marshall *et al.* 1998) considerando-se todos os indivíduos adultos como potenciais parentes. Dessa forma, estimou-se o poder de exclusão de parentesco de cada loco e dos oito locos combinados, bem como os valores críticos da estatística  $\Delta$  (delta), de forma que os resultados das análises de paternidade pudessem ser avaliadas estatisticamente.

Por meio de simulações feitas com as frequências alélicas da população, o programa gera um escore da probabilidade de parentesco do pai verdadeiro ( $LOD_1$ ) e a compara em relação à probabilidade de parentesco de cada um dos outros candidatos ( $LOD_2, LOD_3, \dots, LOD_n$ ). Para cada progênie gerada por simulação, um valor de  $\Delta$  é calculado; sendo  $\Delta$  a diferença entre o valor LOD do pai verdadeiro para o segundo mais provável candidato. Um valor crítico de  $\Delta$ , suficientemente grande para distinguir pais verdadeiros e falsos, é encontrado com um nível de confiança de 95% e aplicado aos dados reais. Os dois primeiros classificados são então considerados os pais, sem distinção de quem seria a árvore-mãe ou a árvore-pai.

A diferenciação genética dentro de uma população é determinada por uma correlação negativa entre o grau de parentesco e a distância espacial e por uma correlação positiva entre grau de parentesco e distância temporal. Desta forma, indivíduos geneticamente relacionados que estejam espacialmente próximos ou com sobreposição no período de floração, geram estruturação genética, seja ela espacial ou temporal, ou ambas.

Os padrões espaciais da variabilidade genética foram caracterizados pela relação entre o grau de parentesco e a distância espacial entre indivíduos, considerando (i) pares entre todos os indivíduos com DAP acima de 10 cm e (ii) pares de indivíduos dentro de duas coortes, (1) 55 Adultos: indivíduos com DAP maior que 45 cm e (2) 51 Plântulas, estabelecidas em 2003 ou 2002. Já os padrões temporais da variabilidade genética foram obviamente testados apenas para a classe madura reprodutivamente. Os dados espaciais de todos os indivíduos da população com DAP superior a 10 cm e fenológicos para 21 indivíduos adultos aqui analisados foram gentilmente cedidos por James Grogan, PhD (IMAZON, Belém) e estão descritos em sua tese de Doutorado (Grogan 2001).

O grau de parentesco foi estimado computando-se o índice R (Queller & Goodnight 1989):

$$R = \frac{\sum_x \sum_k \sum_l (P_y - P^*)}{\sum_x \sum_k \sum_l (P_x - P^*)}$$

onde: **x** indexa os indivíduos; **k** indexa os *loci* e **l** indexa a posição alélica (**l** = 1 ou 2, para indivíduos diplóides).

$P_x$  = A frequência para o indivíduo  $x$  corrente do alelo presente no locus  $k$  e posição alélica  $l$ . Esse valor deve ser 0,5 ou 1,0.

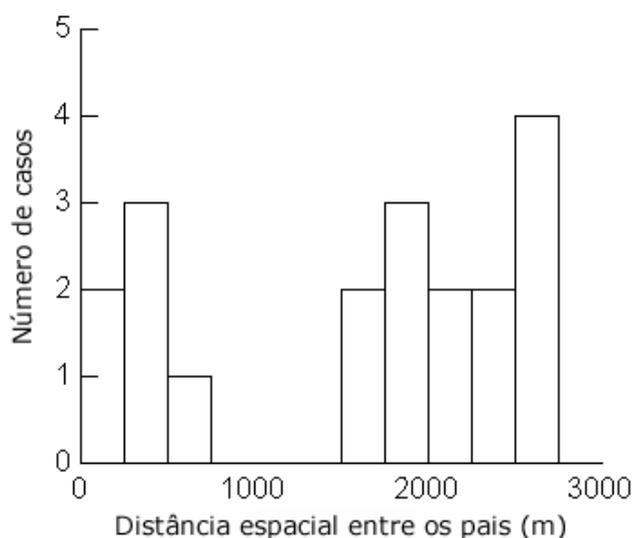
$P_y$  = A frequência desse mesmo alelo para o indivíduo ao qual se está medindo o grau de parentesco em relação ao indivíduo  $x$ .

$P^*$  = A frequência desse alelo na população como um todo.

As matrizes par-a-par de indivíduos, com o valor dos graus de parentesco  $R$  de Queller e Goodnight (1989) e as distâncias espaciais euclidianas e temporais (distância das datas de início da floração de 21 indivíduos da população de Marajoara para os anos entre 1997 e 2001) foram geradas pelo programa SPAGEDI (Hardy & Vekemans 2002). Para realizar a correlação entre as matrizes (teste de Mantel), utilizei o programa NTSYS 2.02 (1998).

## RESULTADOS

O poder de exclusão de parentesco dos oito locos combinados foi de 0,995755 para o primeiro parente e de 0,999811 para o segundo. Com base na análise de parentesco, o fluxo de pólen foi reconstruído a partir de 19 cruzamentos identificados (Figura 4).



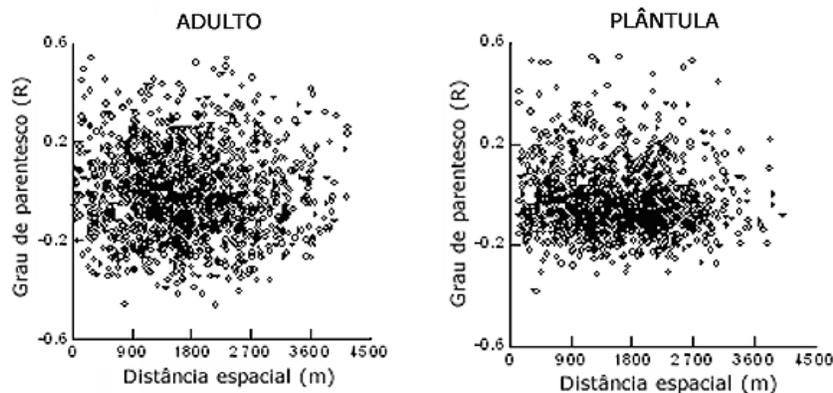
**Figura 4.** Distribuição da distância entre os pais identificados na análise de parentesco de plântulas de uma população manejada de *Swietenia macrophylla* na Amazônia oriental.

O cruzamento identificado com a menor distância entre os pais foi de 69,1 m e o maior foi de 2.736,1 m. A distância média do fluxo de pólen foi de 1.610,0 m com desvio padrão de 963,7.

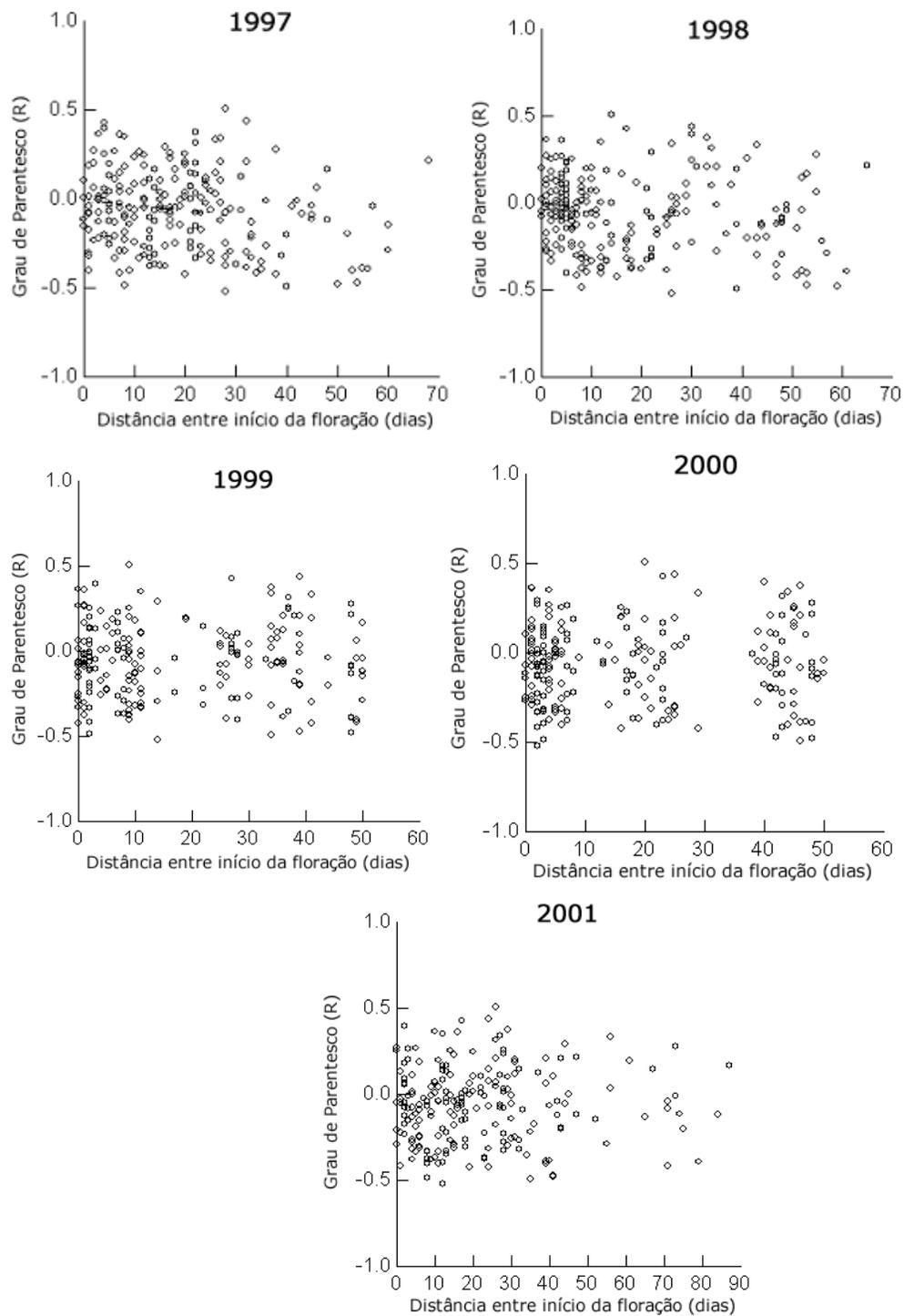
Uma vez que a análise dos genótipos é baseada no tamanho dos alelos microssatélites e devido a ocorrência de artefatos técnicos, como a adição de adenina nas reações em cadeia da polimerase, erros de arredondamento dos alelos pelo programa Genotyper e picos de fluorescência deslocados, alguns

genótipos podem não ser reais. O programa CERVUS leva em consideração a possibilidade de erros na genotipagem, a partir de uma proporção esperada de engano. Das 51 plântulas cujos cruzamentos foram identificados, 40% destes não tiveram nenhuma incongruência entre os genótipos das plântulas e dos pais, e os 60% restantes não tiveram mais que duas incongruências, porém foram excluídos da análise da extensão do fluxo de pólen.

As correlações entre grau de parentesco (R) e distâncias espaciais foram feitas levando-se em consideração duas coortes: adultos e plântulas (Figura 5). Ambas mostraram uma tênue estruturação genética espacial, indicando que indivíduos espacialmente próximos não são necessariamente mais geneticamente relacionados. Já para as correlações entre a data de início da floração e o grau de parentesco (Figura 6), não houve nenhuma correlação significativa positiva para nenhum dos anos entre 1997 e 2001.



**Figura 5.** Distribuição da variabilidade genética de indivíduos de *Swietenia macrophylla* em uma população na Amazônia oriental pelo espaço. Correlação entre grau de parentesco e distância espacial em adultos e plântulas (Teste de Mantel, com 1000 permutações - Adultos:  $r=-0,40385$   $p=0,0010$ ; Plântulas:  $r=-0,37258$   $p=0,0010$ ).



**Figura 6.** Distribuição da variabilidade genética de indivíduos de *S. macrophylla* em uma população na Amazônia oriental pelo tempo. Correlação entre grau de parentesco e distância entre dias de início da floração entre 1997 e 2001 (Teste de Mantel, com 1000 permutações - 1997:  $r=0,02739$   $p=0,3866$ ; 1998:  $r=0,08566$   $p=0,1898$ ; 1999:  $r=0,07993$   $p=0,1848$  ; 2000:  $r=0,10249$   $p=0,1259$ ; 2001:  $r=-0,10982$   $p=0,1688$ ).

## DISCUSSÃO

Árvores em ecossistemas tropicais são polinizadas por uma grande diversidade de polinizadores e geralmente não são dependentes de um pequeno grupo de organismos mutualísticos, apesar de apenas alguns destes polinizadores serem numericamente dominantes (Ghazoul & McLeish 2001).

Árvores emergentes potencialmente produzem muitas flores e também devem atrair os polinizadores a distâncias longas. O corte seletivo, que se concentra em árvores maiores, potencialmente reduz a produção de flores da população e também o fluxo de pólen, afetando o sucesso reprodutivo e a conseqüente regeneração da população (Grogan 2001; Nason & Hamrick 1997). Como efeito da diminuição da densidade populacional ocasionada pelo corte seletivo na população de mogno de Marajoara, os polinizadores tiveram que percorrer distâncias maiores até encontrar outro indivíduo florindo. Ghazoul & McLeish (2001) demonstram que há uma forte relação negativa entre a produção de frutos e o grau de isolamento de indivíduos de *Shorea siamensis*. Já Aldrich & Hamrick (1998) e Dick (2001) mostraram que populações remanescentes de *Symphonia globurifera* e *Dinizia excelsa*, respectivamente, receberam importantes quantidades de pólen de árvores isoladas em pastos adjacentes, demonstrando o efeito da diminuição da densidade de adultos na polinização. Cruzamentos a longa distância em *Swietenia macrophylla* na população manejada de Marajoara podem ser observados na Figura 4.

Este trabalho se diferencia dos demais trabalhos que analisam a extensão do fluxo de pólen num aspecto importante. As análises de parentesco foram realizadas a partir de dados genotípicos de plântulas, ou seja, indivíduos estabelecidos e não a partir de dados genotípicos de sementes (indivíduos em estágio pré-dispersão), isso deve ter influências no padrão da dispersão do pólen, onde em geral, eventos de longa distância são categoricamente mais raros (Austerlitz *et al.* 2004). Ou seja, os indivíduos analisados no presente trabalho representam cruzamentos bem-sucedidos, que geraram indivíduos que se estabeleceram.

Grogan (2001) mostrou que para a população de Marajoara, períodos individuais de floração são duas a cinco vezes menores que o período de floração da população como um todo. Conseqüentemente, indivíduos florindo no início do período de floração ficam parciais ou totalmente isolados reprodutivamente daqueles florindo no final do período, diminuindo o número de potenciais parceiros para um dado indivíduo. Porém, os resultados das Figuras 5 e 6 sugerem a existência de dispersão de sementes de longa distância e fluxo de pólen predominantemente entre indivíduos não aparentados, a partir da baixa estruturação genética intra-populacional em Marajoara. Além disso, múltiplos eventos de colonização, a partir de linhagens distintas, também poderiam estar gerando o padrão de baixa estruturação espacial observado. Essa pouca estruturação genética intra-populacional evidencia e privilegia a manutenção da diversidade genética, reduzindo a possibilidade de endocruzamentos.

Lemes (2000) detectou uma endogamia biparental na população de Marajoara. Esta endogamia pode ter sido gerada por um efeito aditivo das tênues estruturas genéticas espaciais e temporais. Ou ainda por algum efeito topográfico na estruturação genética, que poderia estar isolando populações entre micro-bacias, uma vez que os indivíduos de mogno ocorrem com frequência associado aos pequenos cursos d'água (Grogan 2001).

## CAPÍTULO 2

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM UMA POPULAÇÃO MANEJADA DE  
MOGNO (*Swietenia macrophylla* KING – MELIACEAE) NA  
AMAZÔNIA ORIENTAL****INTRODUÇÃO**

A madeira de *Swietenia macrophylla* é valorizada no mercado madeireiro internacional pela sua cor atrativa, durabilidade, estabilidade dimensional e facilidade de manuseio em carpintaria (Lamb 1966). É o recurso florestal madeireiro de maior valor comercial dos Neotrópicos, e vem sendo largamente explorado e comercializado no Brasil desde os anos 60 (Veríssimo *et al.* 1995).

É conhecida a pressão exercida sobre as populações remanescentes de *S. macrophylla*, além dos altos prejuízos causados às florestas e às comunidades humanas locais, especialmente os indígenas (Veríssimo *et al.* 1995; Grogan *et al.* 2002). Todavia, ainda eram especulativos os efeitos da exploração na estrutura e diversidade genética em populações de mogno na Amazônia brasileira.

O corte seletivo necessariamente reduz a densidade populacional local de indivíduos reprodutivos. Como a diversidade genética está associada à densidade (Nason 2002), então espécies com baixas densidades populacionais, resultantes da ação antrópica, devem estar sofrendo uma redução na diversidade genética, devido a perda de alelos da população (Murawski *et al.* 1994; Bawa 1993). Além disso, os níveis de endocruzamento também podem

ser dependentes da densidade populacional (Murawski *et al.* 1994) e devem ser também afetados pelo corte seletivo.

Além do mais, o corte seletivo está associado à fragmentação florestal e não só à redução na densidade de indivíduos reprodutivos da população. Para um manejo florestal sustentável é urgente e necessário o conhecimento dos efeitos quantitativos da redução do tamanho efetivo da população e da diversidade genética que é mantida residente na população pós-corte e sobre os processos regenerativos. Ainda, o efeito do desmatamento na estrutura genética das populações depende da interação entre a escala do desmatamento e a estrutura genética pré-existente (Aldrich *et al.* 1998).

As principais medidas de diversidade genética são: o número de alelos observados por *loco* ( $A$ ) e a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) que representa o número esperado de genótipos heterozigotos num dado *loco*, previsto segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hartl & Clark 1997). A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) é a proporção média de genótipos observados num dado *loco*, ou seja, a frequência de heterozigotos observados, dividido pelo total de indivíduos amostrados. Outra importante medida de diversidade genética aqui considerada é o número de genótipos distintos ( $G_O$ ), que representa o número de genótipos únicos observados numa determinada população ou subpopulação (por exemplo, entre coortes), com base numa análise multilocos. Aldrich *et al.* (1998) utilizaram essa medida de diversidade para analisar diversidade genética em diferentes estágios de vida (plântulas, jovens e adultos) em populações da espécie arbórea *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) na Costa Rica.

O endocruzamento ocorre quando há auto-fecundação ou quando indivíduos aparentados se cruzam. A principal consequência genética do endocruzamento numa população é o aumento da frequência de genótipos homocigotos, aumentando, com isso, a expressão de mutações deletérias (Hartl & Clark 1997). Assim, os efeitos do endocruzamento são quantificáveis em termos da consequente redução na heterocigosidade observada (Hartl & Clark 1997). Comparando a proporção de heterocigotos na população ( $H_0$ ) com a proporção esperada caso a população estivesse cruzando ao acaso (equilíbrio de Hardy-Weinberg) ( $H_E$ ), obtêm-se o coeficiente de endocruzamento ( $f$ ):

$$f = (H_E - H_0) / H_E$$

O coeficiente de endocruzamento mede a redução fracional na heterocigosidade. É uma medida que varia de zero, quando não há endocruzamento na população, a um, quando só há cruzamentos entre parentes ou auto-fecundação.

A erosão genética é a redução na aptidão dos indivíduos gerados por endocruzamento, em comparação àqueles gerados por fecundação cruzada (Allaby 1998). É causada principalmente pela expressão em homocigose de alelos recessivos deletérios e letais, bem como pela perda de variação potencialmente adaptativa em caracteres quantitativos por deriva genética (Alvarez-Buylla *et al.* 1996; Meffe & Carroll 1997).

A auto-fecundação é evitada em *S. macrophylla* porque a antese das flores masculinas e femininas não é sincrônica em um mesmo indivíduo (Styles 1972). Porém, grupos aparentados de árvores podem estar cruzando devido à floração simultânea da maioria dos indivíduos em uma população (Lemes *et al.*

2003; Grogan 2001). A idade na qual a floração inicia e o grau de agregamento e/ou a sincronia de floração dos indivíduos da população, determinam o número de possíveis pares para o cruzamento num dado tempo (Grogan 2001). Em estudo sobre o sistema de cruzamento de *S. macrophylla*, Lemes (2000) demonstrou que o mogno parece adaptado a reproduzir-se preferencialmente por fecundação cruzada, entretanto observou-se a ocorrência de endogamia em alguns indivíduos da população estudada. Além disso, as flores de mogno são polinizadas por diversos insetos generalistas, principalmente abelhas e mariposas (Styles 1972), os quais são conhecidos por percorrerem distâncias limitadas (Bawa 1993). Assim, se uma dada população for geneticamente estruturada, curtas distâncias de polinização podem restringir oportunidades de intercâmbio gênico entre indivíduos distantes (Lemes *et al.* 2003), favorecendo a endogamia na população.

O tempo desde a redução na densidade de indivíduos reprodutivos numa determinada área pode ser menor que o tempo de vida dos indivíduos da espécie. Neste caso, dados sobre a geração adulta revelarão apenas uma estrutura genética pré-existente ao invés de taxas atuais de diferenciação genética. Para uma análise apropriada, torna-se necessária uma abordagem demográfica envolvendo adultos e regenerantes (plântulas, por exemplo) (Aldrich *et al.* 1998). No presente estudo, quantifiquei o efeito da redução na densidade populacional de *S. macrophylla*, causada pelo corte seletivo, na diversidade genética da população estudada. Espera-se que os dados possam subsidiar práticas de manejo florestal de populações nativas de *S. macrophylla*, considerando-se a necessidade de garantir a ocorrência de fluxo

gênico entre árvores remanescentes da exploração seletiva, evitando assim a erosão genética nas populações.

## MÉTODOS

A fim de avaliar quantitativamente o efeito da exploração seletiva na variabilidade genética de *S. macrophylla*, após o corte de 70% dos indivíduos adultos na população Marajoara, foi estimada e comparada a diversidade genética entre diferentes coortes de mogno, considerando-se o estabelecimento de uma coorte antes do corte seletivo (adultos) e outra após (plântulas).

Para realização das análises genéticas foram coletadas amostras de tecido vegetal (folhas), considerando-se duas classes distintas: 1) 55 Adultos: indivíduos com DAP maior que 45 cm e 2) 51 Plântulas, estabelecidas em 2003 ou 2002. Todos os indivíduos adultos foram previamente mapeados por Grogan (2001), o que permitiu a localização dos indivíduos em campo e a determinação das distâncias entre os mesmos. Para localização e coleta de amostras das plântulas foram percorridos 16 transectos lineares paralelos de 3 km de comprimento, distantes 200 m um do outro na área de estudo. O padrão espacial da coleta das plântulas na área de estudo foi similar a dos adultos.

Com base nos genótipos obtidos pela análise de oito locos microssatélites foram então estimados: o número de alelos ( $A$ ), as heterozigosidades médias esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), o número de genótipos multilocos distintos ( $G_o$ ) e o coeficiente de endocruzamento ( $f$ ) para as coortes estudadas. As estimativas genéticas ( $H_e$ ,  $H_o$  e  $f$ ) foram realizadas utilizando-se o programa GDA 1.1 (Lewis & Zaykin 2001). O número de genótipos multilocos distintos foi calculado segundo Aldrich *et al.* (1998). Para determinar o nível de

significância quanto a diferenças observadas entre gerações, nas medidas de diversidade genética, foi utilizado o teste Wilcoxon (Sokal & Rohlf 1995) no pacote estatístico Systat 9.0 (Wilkinson 1998).

## RESULTADOS

O número de alelos variou de apenas 3 no loco *sm47* das plântulas até 16 nos locos *sm01* e *sm31* dos adultos. Já a heterozigosidade esperada variou de 0,407 (loco *sm47* das plântulas) até 0,910 (loco *sm31* dos adultos). Em geral, para todos os índices de diversidade genética, as plântulas possuíram valores significativamente menores que os adultos (Tabela 2). As diferenças significativas entre as coortes dos adultos e das plântulas foram uma redução de aproximadamente 20 % no número de alelos ( $Z=2,555$ ;  $p=0,011$ ), de 10 % na heterozigosidade observada ( $Z=2,240$ ;  $p=0,025$ ), e de 40 % no número de genótipos multilocos distintos ( $Z=2,205$ ;  $p=0,027$ ). Essa situação indica que, em geral houve grande perda de diversidade genética com o corte seletivo.

O corte seletivo foi também responsável pela eliminação de alguns alelos na população, aumentando como consequência a proporção de homozigotos ( $H_o$ ). O índice de endocruzamento ( $f$ ) dobrou ( $Z=-2,380$ ;  $p=0,017$ ) na coorte das plântulas em comparação com os adultos, em função dessa redução na heterozigosidade (Tabela 2).

**Tabela 2.** Diversidade genética (A=número de alelos; He=heterozigosidade esperada; Ho=heterozigosidade observada; Go=genótipo único) e índice de endocruzamento (f) em coortes de uma população manejada de *Swietenia macrophylla* na Amazônia oriental.

	<b>Loco</b>	<b>A</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b>Go**</b>	<b>f</b>
Plântulas	sm01	12	0,840	0,813	8	0,033
	sm22	12	0,782	0,583	3	0,256
	sm31	13	0,893	0,739	14	0,174
	sm32	12	0,888	0,783	8	0,120
	sm40	8	0,761	0,680	1	0,107
	sm46	5	0,685	0,477	1	0,306
	sm47	3	0,407	0,412	0	-0,012
	sm51	7	0,669	0,683	1	-0,021
		<b>9*</b>	<b>0,741</b>	<b>0,646*</b>	<b>36</b>	<b>0,129*</b>
Adultos	sm01	16	0,875	0,891	15	-0,018
	sm22	13	0,793	0,691	10	0,130
	sm31	16	0,910	0,833	16	0,085
	sm32	13	0,846	0,815	7	0,038
	sm40	10	0,752	0,636	4	0,155
	sm46	7	0,778	0,611	5	0,216
	sm47	5	0,514	0,556	3	-0,081
	sm51	9	0,685	0,745	1	-0,089
		<b>11,125*</b>	<b>0,769</b>	<b>0,722*</b>	<b>61</b>	<b>0,062*</b>

\* = Diferenças significativas no teste de Wilcoxon (A:Z=2,555;p=0,011; Ho:Z=2,240;p=0,025; f: Z=-2,380;p=0,017).

\*\* = Observar que os valores em negrito para Go são os somatórios dos valores por loco (como em Aldrich *et al.* 1998).

## DISCUSSÃO

Populações que sofreram uma redução recente no seu tamanho efetivo populacional exibem uma redução relacionada com o número de alelos e com a heterozigosidade em locos polimórficos (Cornuet & Luikart 1996). Uma vez que quase todos os adultos de uma população são explorados, os efeitos genéticos diretos da retirada de mogno em áreas da Amazônia brasileira devem ser expressivos (Veríssimo *et al.* 1995). Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram uma redução significativa na diversidade genética na coorte estabelecida pós-corte em relação à estabelecida antes do corte.

A coorte de adultos é remanescente de uma população maior e contígua que, um dia, já ocupou àquela região. Já as plântulas são resultado de cruzamentos entre esses indivíduos remanescentes e que hoje se encontram numa paisagem fragmentada e numa floresta alterada, uma vez que houve redução no tamanho efetivo da população com a diminuição da densidade de indivíduos reprodutivos.

Gillies *et al.* (1999) estudaram a diversidade genética em populações de *S. macrophylla* na América central, utilizando marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e também demonstraram que o histórico de exploração estava correlacionado com uma significativa redução de diversidade nas populações analisadas.

O aumento na taxa de endocruzamento, devido à redução no tamanho efetivo da população por corte seletivo, também já foi demonstrado por Murawski *et al.* (1994) em *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae endêmica

do Sri Lanka) através do aumento na proporção de sementes geradas por endocruzamento.

Caso um estágio de vida possua excesso de homozigose gerada por endocruzamentos, então poderia haver uma sobrevivência diferencial, resultante de erosão genética, onde indivíduos heterozigotos teriam maior chance de sobrevivência e passariam para as fases de vida consecutivas. Esta seria uma explicação alternativa para os resultados aqui encontrados, ou seja, que esteja ocorrendo uma seleção diferencial favorecendo indivíduos heterozigotos durante as várias fases do ciclo de vida da espécie. Isso já foi demonstrado em estudos com espécies que possuem dormência e que formam banco de sementes, em geral pioneiras (McCue & Holtsford 1998; Alvarez-Buylla *et al.* 1996b; Cabin 1996; Alvarez-Buylla & Garay 1994; Tonsor *et al.* 1993), o que não é o caso do mogno. Porém, essa alternativa não explica a perda de alelos ocorrida na coorte das plântulas, que deve ter sido gerada pela retirada de indivíduos adultos do *pool* gênico populacional. Além disso, foi observada uma significativa redução no número de combinações gênicas a partir da estimativa do número de genótipo multilocos distintos ( $G_o$ ) para cada coorte.

Independente da seleção diferencial favorecer indivíduos heterozigotos, o corte seletivo geraria uma retirada consecutiva de indivíduos em fases de vida com mais heterozigotos, tendendo mesmo assim a diminuir cumulativamente as combinações gênicas na população.

Dessa forma, devem-se tomar medidas conservadoras quanto ao manejo florestal desta espécie, uma vez que os resultados aqui apresentados

mostraram uma perda de diversidade genética com a redução na densidade de indivíduos adultos na população.

## **CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES PARA O MANEJO E A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE**

O presente trabalho abordou a biologia reprodutiva sob a perspectiva de seus efeitos na dispersão da variabilidade genética no espaço no tempo e o efeito do corte seletivo na diversidade genética de uma importante espécie arbórea da Amazônia.

Lemes *et al.* 2003 mostraram que populações de mogno na bacia amazônica estão estruturadas geneticamente e que cada população comporta uma alta diversidade genética. De modo que a conservação de múltiplas populações do bioma é necessária para a manutenção da espécie nesta escala, uma vez que elas estão isoladas pela longa distância entre os agregados populacionais.

No caso da população de Marajoara no sudeste do Pará, como podemos observar na Figura 5, a variabilidade genética está distribuída aleatoriamente pelos indivíduos, independente das distâncias entre eles. Assim, a probabilidade de um polinizador efetuar a deposição do pólen em uma flor de um outro indivíduo com baixa relação de parentesco é alta. Estes polinizadores possuem a capacidade de se deslocar num raio de 1,5 km (Figura 4), que é uma distância média elevada quando comparada com a encontrada para outras espécies (ver Tabela 1). Os resultados da Figura 5 também sugerem que os eventos de dispersão de sementes que realizaram a colonização da população estudada foram eventos de longa distância, caso contrário indivíduos aparentados estariam próximos entre si.

A relação entre parentesco e sincronia na floração varia ao longo do tempo, mas para um período de pelo menos cinco anos consecutivos, mostrou-se ausente para o mogno na população em foco. Em linhas gerais, isso denota que endocruzamentos podem ser ainda mais difíceis de ocorrerem, graças a assincronia fenológica entre indivíduos aparentados.

As estimativas de dispersão de pólen podem ser sensíveis a perturbações de curto prazo na polinização, que é uma fase crítica do ciclo de vida vegetal. No entanto, estas estimativas não consideram a influência da dispersão de sementes no fluxo gênico e podem não representar padrões de endocruzamento em longo prazo (Aldrich & Hamrick 1998).

Outro importante fator na decisão de estratégias de conservação e manejo da espécie é o número de indivíduos remanescentes em populações exploradas. A espécie mostrou uma perda acentuada de combinações alélicas e na proporção de heterozigotos com a retirada de 70% dos indivíduos adultos da população.

Uma vez que há ausência de estruturação genética espacial e que os cruzamentos devam estar ocorrendo preferencialmente entre indivíduos não aparentados, a perda de alelos na população por redução no tamanho efetivo da população é provavelmente o fator responsável pelo excesso de homozigose em plântulas de *Swietenia macrophylla*.

Grogan (2001) mostrou que a regeneração na população de Marajoara é, na prática, inexistente. Isto deve estar ocorrendo, não só pelos efeitos da extração madeireira no ecossistema florestal e por mudanças no comportamento e diversidade da comunidade de polinizadores, o que afeta

diretamente a produção de frutos (como demonstrado por Ghazoul & McLeish (2001) para *Shorea siamensis*), mas também devido à perda de alelos na população gerada pelo corte seletivo.

Concluindo, aspectos da biologia reprodutiva e do ciclo de vida das espécies devem ser incluídos nos planos de manejo de árvores da Amazônia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allaby, M. 1998. Dictionary of plant sciences. 2 ed. Oxford University Press. 508 p.
- Aldrich, P.R. & Hamrick, J.L. 1998. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. *Science* 281: 103 – 105.
- Aldrich, P.R.; Hamrick, J.L.; Chavarriaga, P. & Kochert, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globurifera*. *Molecular Ecology* 7: 933 – 944.
- Alvarez-Buylla, E.R. & Garay, A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution* 48: 437 – 453.
- Alvarez-Buylla, E.R.; García-Barros, R.; Lara-Moreno, C. & Martínez-Ramos, M. 1996a. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest trees species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 387 - 421.
- Alvarez-Buylla, E.R.; Chaos, A.; Piñero, D. & Garay, A. 1996b. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal and seed banks. *Evolution* 50: 1155 – 1166.
- Austerlitz, F.; Dick, C.W.; Dutech, C.; Klein, E.K.; Oddou-Muratorio, S.; Smouse, P.E. & Sork, V. 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Molecular Ecology* (no prelo).
- Barros, P. L. C., Queiroz, W.T., Silva, J. N. M., Oliveira, J. N. M. F. A., Filho, P. P. C., Terezo, E. F. M., Farias, M. M. & Barros, A. V. 1992. *Natural and artificial reserves of Swietenia macrophylla King, in the Brazilian Amazon - a perspective for conservation*. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém, Brazil.
- Bawa, K.S. 1993. Effects of deforestation and forest fragmentation on genetic diversity in tropical tree populations. *In: Genetic Conservation and Production of Tropical Forest Tree Seed*. (eds. Drysdale, R.M.; John, S.E.T. nad Yapa, A.C.), p. 10-16. ASEAN – Canada Forest Tree Seed Centre, Chiang Mai, Thailand.

- Boshier, D.H.; Chase, M.R. & Bawa, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia allidora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood, and population substructure. *American Journal of Botany* 82 (4): 484 – 490.
- Cabin, R.J. 1996. Genetic comparisons of seed bank and seedling populations of a perennial desert mustard, *Lesquerella fendleri*. *Evolution* 50: 1830 – 1841.
- Chase, M.R.; Moller, C.; Kessell, R. & Bawa, K.S. 1996. Distant gene flow in tropical trees. *Nature* 383: 398 - 399.
- CITES. 2003. Appendices I, II and III.  
<http://www.cites.org/eng/append/appendices.shtml>.
- Condit, R. & Hubbell, S. P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- Cornuet, J.M. & Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Dayanandan, S.; Dole, J.; Bawa, K. & Kesseli, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology* 8: 1585 – 1592.
- Dick, C. 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 2391 – 2396.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13 – 15.
- Ellstrand, N.C. 1992a. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos* 63: 77 - 86.
- Ellstrand, N.C. 1992b. Gene flow among seed plant populations. *New Forests* 6: 241 – 256.
- Ennos, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250 – 259.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. EMBRAPA, Brasília. 220 p.

- Ghazoul, J. & McLeish, M. 2001. Reproductive ecology of tropical forest trees in logged and fragmented habitats in Thailand and Costa Rica. *Plant Ecology* 153: 335 – 345.
- Gillies, A. C. M. , Navarro, C., Lowe, A. J., Newton, A. C., Hernández, M., Wilson, J. & Cornelius, J. P. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. *Heredity* 83: 722-732.
- Grogan, J.; Barreto, P. & Veríssimo, A. 2002. *Mogno na Amazônia brasileira: ecologia e perspectivas de manejo*. IMAZON, Belém. 64 p.
- Grogan, J.E. 2001. Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in southeast Pará, Brazil. A life history study with management guidelines for sustained production from natural forests. PhD Thesis, Yale University, New Haven, USA.
- Gullison, R.E.; Panfil, S.N.; Strouse, J.J. & Hubbell, S. 1996. Ecology and management of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in the Chimanes forest, Beni, Bolivia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122: 9 – 34.
- Hamrick, J.L. & Murawski, D.A. 1991. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon Neotropical species. *Journal of Tropical Ecology* 7: 395 - 399.
- Hardy, O.J. & Vekemans, X. 2002. SPAGEDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618 – 620.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. 1997. *Principles of population genetics*. 3 ed. Sinauer. 542 p.
- Kaufman, S.R.; Smouse, P.E. & Alvarez-Buylla, E.R. 1998. Pollen-mediated gene flow and differential male reproductive success in a tropical pioneer tree, *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Moraceae): a paternity analysis. *Heredity* 81: 164 - 173.
- Konuma, A.; Tsumura, Y.; Lee, C.T.; Lee, S.L. & Okuda, T. 2000. Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. *Molecular Ecology* 9: 1843 – 1852.

- Lacy, R.C. 1986. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology* 1: 143 - 158.
- Lamb, F. B. 1966. *Mahogany of Tropical America: Its Ecology and Management*. The University of Michigan Press, Ann Arbor.
- Lemes, M.R.; Gribel, R.; Proctor, J. & Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology* 12: 2875 - 2883.
- Lemes, M.R.; Brondani, R.P.V. & Grattapaglia, D. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened Neotropical timber species. *The Journal of Heredity* 93: 287 - 291.
- Lemes, M.R. 2000. Population genetic structure and mating system of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) in the Brazilian Amazon: implications for conservation. PhD Thesis. University of Stirling, Stirling, UK.
- Lewis, P. O. & Zaykin, D. 2001. *Genetic Data Analysis*: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Programa gratuito disponível em <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- Litt, M & Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle of actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397 - 401.
- MacCauley, D.E. 1997. The relative contributions of seed and pollen movement to the local genetic structure of *Silene alba*. *Journal of Heredity* 88: 257 - 263.
- Martini, A.; Rosa, N.A. & Uhl, C. 1998. *Espécies de árvores potencialmente ameaçadas pela atividade madeireira na Amazônia*. Série Amazônia nº 11. IMAZON, Belém. 35p.
- Marshall, T.C., Slate, J.; Kruuk, L. & Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639 - 655.

- McCue, K.A. & Holtsford, T.P. 1998. Seed bank influences on genetic diversity in the rare annual *Clarkia springvillensis* (Onagracea). *American Journal of Botany* 85: 30 – 36.
- Meffe, G.K. & Carroll, C.R. 1997. Genetics – conservation of diversity within species. In: *Principles of conservation biology* (eds. Meffe, G.K. & Carroll, C.R.). 2ª ed. P. 161 – 201. Sinauer. Massachusetts.
- Morgante, M. & Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182.
- Murawski, D.A.; Gunatilleke, I.A.U.N. & Bawa, K.S. 1994. The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. *Conservation Biology* 8: 997-1002.
- Nason, J.D. 2002. La estructura genética de las poblaciones de árboles. In: *Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales*. p 299 – 327. (eds.) Guariguta, M.R. & Kattan, G.H. Libro Universitario Regional. Costa Rica.
- Nason, J.D. & Hamrick, J.L. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. *Journal of Heredity* 88: 264 - 276.
- Nason, J.D.; Herre, E.A. & Hamrick, J.L. 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature* 391: 685 – 687.
- Novick, R.R.; Dick, C.W.; Lemes, M.R.; Navarro, C.; Caccone, A. & Bermingham, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analyses. *Molecular Ecology* 12: 2885 – 2893.
- NTSYS 2.02. 1998. Applied Biostatistics Inc.
- Oddou-Moratorio, S.; Demesure-Musch, B.; Pélissier, R. & Gouyon, P.H. 2004. Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sorbus torminalis* L. Crantz. *Molecular Ecology* 13: 3689 – 3702.
- Pearse, D.E. & Crandall, K.A. 2004. Beyond Fst: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5: 585 – 602.
- Powell, W.; Machray, G.C.; Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1: 215-222.

- Projeto DENDROGENE. 2005. [www.cpatu.embrapa.br/dendro/index.htm](http://www.cpatu.embrapa.br/dendro/index.htm). Acessado em Agosto de 2005.
- Queller, D.C. & Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258 - 275.
- Rafalski, J. A., Vogel, J. M., Morgante, M., Powell, W, Andre, C. & Tingey, S. V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: *Analysis of Non-mammalian Genomes - a practical guide* (eds Birren, B & Lai, E.) pp 75-134. Academic Press, New York.
- Ritland, K. 1983. Estimation of mating systems. In: *Isozymes in plant breeding and genetics, part A*. (eds Tanksley, D. & Orton, T. J.) pp. 289-302. Elsevier, Amsterdam.
- Savolainen, O. & Kärkkäinen, K. 1992. Effect of forest management on gene pools. *New Forests* 6: 329 - 345.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393-430.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995. *Biometry*, 3rd. Edition. W.H. Freeman, New York.
- Stacy, E.A.; Hamrick, J.L.; Nason, J.D.; Hubbell, S.P.; Foster, R.B. & Condit, R. 1990. Pollen dispersal in low-density populations of three neotropical tree species. *The American Naturalist* 148: 275 - 298.
- Styles, B.T. 1972. The flower biology of the Meliaceae and its bearing on tree breeding. *Silvae genetica* 21: 175 - 182.
- Tautz, D. & Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138.
- Tonsor, S.J.; Kalisz, S.; Fisher, J. & Holtsford, T.P. 1993. A life-history based study of population genetic structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata*. *Evolution* 47: 833 - 843.
- Veríssimo, A.; Barreto, P.; Tarifa, R. & Uhl, C. 1995. Extraction of a high-value natural resource in Amazonia: the case of mahogany. *Forest Ecology and Management* 72: 39 - 60.
- 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 Sciences* 99: 2038 – 2042.

Wilkinson, L. 1998. Systat: the system for statistics. Evanston, IL, Sysytat Inc.

Wright, S.J. 2002. Plant diversity in tropical forests: a review of mechanisms of species coexistence. *Oecologia* 130:1 - 14.



