
DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E DIVERSIDADE EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *CRYPTOCARYA ASCHERSONIANA* MEZ (LAURACEAE)

Pedro Luís Rodrigues de Moraes^{1,2} & Maria Teresa Vitral de Carvalho Derbyshire^{1,3}

Biota Neotropica v3 (n1) – <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01803012003>

Recebido em 19/09/2002

Revisado em 02/04/2003

Publicado em 17/04/2003

¹ Bolsa de Pós-Doutoramento a P.L.R. Moraes (FAPESP 99/05004-5), auxílio à pesquisa (BIOTA/FAPESP 99/05818-2); ² Departamento de Botânica, UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil; ³ Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA/USP, Caixa Postal 96, 13400-970, Piracicaba, SP, Brasil
Autor para correspondência: E-mail: pmoraes@unicamp.br

Abstract

The genetic variability and structure of natural populations of *Cryptocarya aschersoniana* Mez were investigated by means of isozymes. Leaf samples of 267 adult individuals were collected from 12 populations native of “Floresta de Planalto” of the State of São Paulo and Southern Minas Gerais State, Brazil. From 39 polymorphic allozyme loci analysed, the divergence obtained through G_{ST} estimates suggests the existence of significant genetic drift and/or natural selection effects between populations. The level of gene differentiation ($\hat{G}_{ST} = 0.340$) was extremely high. The within sample gene diversity ($H_s = 0.365$) account for 66.12% of the overall gene diversity, indicating a greater variability occurring within populations than among them. Goodness of fit tests for mutation-drift equilibrium showed that none of these populations was in equilibrium. From coancestry distance of Reynolds, divergences between pair of populations were also relatively high, which could be associated to bottleneck effects due to present forest fragmentation in analysed populations.

Key words: *allozymes, Lauraceae, genetic distance, genetic variability, population differentiation, Neotropics, Cryptocarya aschersoniana, Atlantic Forest, Brazil*

Resumo

A variabilidade genética e estrutura de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez foram investigadas através de isoenzimas. Amostras de folhas de 267 indivíduos adultos foram coletadas de 12 populações procedentes de “Florestas de Planalto” do estado de São Paulo e sul de Minas Gerais, Brasil. A partir de 39 locos alozímicos polimórficos analisados, a divergência obtida através das estimativas de G_{ST} sugerem a existência de deriva genética significativa e/ou de efeitos de seleção natural entre populações. O nível de diferenciação gênica ($\hat{G}_{ST} = 0,340$) foi extremamente alto. A diversidade gênica dentro das populações ($H_s = 0,365$) foi responsável por 66,12% da diversidade gênica total, indicando a existência de uma maior variabilidade ocorrendo dentro das populações do que entre as mesmas. Os testes de aderência ao Equilíbrio de Mutação e Deriva indicaram que nenhuma dessas populações encontra-se em equilíbrio. A partir da distância de Reynolds, verificou-se que as divergências entre os pares de populações foram também relativamente altas, sendo que poderiam estar associadas a efeitos de gargalo populacional devido à fragmentação florestal presente nas populações analisadas.

Palavras-chave: *alozimas, Lauraceae, distância genética, variabilidade genética, diferenciação populacional, Neotrópico, Cryptocarya aschersoniana, Mata Atlântica, Brasil*

Introdução

O uso de isoenzimas em estudos de biologia evolutiva de plantas expandiu rapidamente nos últimos anos. Estas são ferramentas eficientes para o estudo da variabilidade genética por exibirem herança mendeliana, expressão codominante, completa penetrância e ausência de interações pleiotrópicas e epistáticas, propriedades que facilitam a análise genética (Weeden & Wendel 1990, Clement et al. 1997). O conhecimento atualmente acumulado dos estudos com isoenzimas sobre a estrutura genética de espécies arbóreas tropicais tem mostrado que as mesmas apresentam níveis elevados de variabilidade genética e diferenciação inter-populacional (Loveless 1992, Liengsiri et al. 1995, Moraes et al. 2002).

Dentro do âmbito conservacionista, é concensual que as reservas florestais e os parques das regiões tropicais devem ser estabelecidos e manejados de maneira a preservar a máxima variabilidade genética dentro das espécies (Soulé 1980, Whitmore 1980, Schierenbeck et al. 1997). Porém, sem dados sobre a distribuição dessa variabilidade dentro ou entre populações, decisões razoáveis sobre os meios mais efetivos para a sua preservação não podem ser tomadas (Marshall & Brown 1975, Ashton 1981, Loveless et al. 1998).

Adicionalmente, a diversidade genética das espécies arbóreas tropicais vem sendo ameaçada pelo desmatamento, atividade madeireira e avanço do processo de fragmentação florestal. As conseqüências do desmatamento sobre a perda da biodiversidade em nível específico são relativamente bem conhecidas (Simberloff 1986, Myers 1988, Chase et al. 1995). Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos do desmatamento sobre a perda da diversidade genética dentro das espécies (Hall et al. 1994, Hall et al. 1996, Young et al. 1996, Seoane et al. 2000).

Em estudo com as mesmas populações aqui estudadas, Moraes & Derbyshire (2002) encontraram, através da abordagem de análise de variância, que os indivíduos destas populações devem ser panmíticos e que a diversidade entre populações foi bastante elevada. O fluxo gênico estimado em apenas 0,4 indivíduos por geração indicou a importância de efeitos de deriva genética como prováveis causadores da pronunciada diferenciação populacional.

Complementarmente, desvios significativos do Equilíbrio de Mutação e Deriva (p.ex., efeitos de gargalo) são importantes de serem detectados porque a condição deste equilíbrio é um dos pressupostos requeridos em vários modelos genéticos de populações, tal qual, p.ex., o da distância genética de Nei (Nei 1987). Da mesma forma, os efeitos de gargalo populacional são importantes de serem detectados em biologia da conservação, porque podem aumentar o risco de extinção. Similarmente, os efeitos de fundador também são importantes, porque podem ser fundamentais em alguns modos de especiação (Piry et al. 1999).

Um dos objetivos do presente trabalho foi o estudo da diferenciação genética de populações de *Cryptocarya aschersoniana* Mez, através da abordagem introduzida por Nei (1973) da análise da diversidade gênica em populações subdivididas (estatísticas *G* de Nei 1977, 1987). Esse autor mostrou que a diversidade genética da população total poderia ser partida em seus componentes de diversidade genética intra e interpopulacional, quando a mesma fosse definida como a heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Na teoria de Nei, a diversidade genética foi definida pelo uso de frequências gênicas da geração atual, não tendo nenhuma pressuposição acerca dos pedigrees dos indivíduos, bem como da seleção e migração no passado. Isto fez com que esta abordagem pudesse ser empregada para qualquer situação, com ou sem seleção.

Um segundo objetivo foi o de analisar as populações de *C. aschersoniana* sob o contexto de distâncias genéticas de coancestralidade de Reynolds, levando-se em consideração o papel da deriva genética como principal promotor da diferenciação populacional.

Material e Métodos

Um ramo foliar portador de folhas maduras foi coletado de indivíduos adultos da espécie *Cryptocarya aschersoniana* Mez, acondicionados em sacos plásticos, que por sua vez foram armazenados em caixas de isopor com gelo para o transporte até o laboratório. Uma vez no laboratório, foram mantidos em geladeira ($\cong 5^{\circ}\text{C}$) até sua extração e análise eletroforética após aproximadamente dois dias em média.

A identificação da espécie foi feita a partir de material herborizado e depositado no herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESA). As populações amostradas são as mesmas investigadas por Moraes & Derbyshire (2002), provenientes das seguintes localidades: Mata do Alemão (MA), Ibaté (I), Fazenda São José (SJ), Serra de São Pedro (SP), Bosque dos Jequitibás (BJ), Bosque dos Alemães (BA), Bosque dos Italianos (BI), Mata de Santa Genebra (SG), Fazenda Barreiro Rico (BR), região de Mogi Mirim (MM), Fazenda Campininha (FC) e sul de Minas Gerais, São Sebastião do Paraíso (SSP).

A partir do emprego de marcadores alozímicos, revelados pela eletroforese em gel de amido, fez-se a caracterização genética das populações analisadas, seguindo-se principalmente as recomendações de Alfenas et al. (1991). A metodologia empregada para as análises eletroforéticas encontra-se descrita em Moraes & Derbyshire (2002).

Foram utilizados 19 sistemas isoenzimáticos que apresentaram boa resolução de bandas e polimorfismo. A partir dos zimogramas gerados, 39 locos polimórficos foram empregados nas análises genéticas, a saber: Acp-1, Acp-2,

Acp-3, Alp-1, Alp-2, Cat-1 e Cat-2 (método de Alfenas et al. 1991), Cat-1, Cat-2 e Cat-3 (método de Scandalios 1965), Dia-1, Dia-2, Dia-3, α -Est-1, β -Est-1, Gdh, Got, Idh, Mdh-1, Mdh-2, Nadhdh, Nadphdh, 6Pgdh-1, 6Pgdh-2, 6Pgdh-3, Pgi-1, Pgi-2, Ppo-1, Ppo-2, Prx-1, Prx-2, Prx-3, Prx-4, Prx-5, Skdh-1, Skdh-2, Sod-1, Sod-2 e Sod-3.

A partir da interpretação dos zimogramas e conseqüente definição dos genótipos de cada indivíduo estudado, para os marcadores empregados, calcularam-se as frequências alélicas para cada população amostrada. A diferenciação genética entre as populações foi analisada através da análise da diversidade gênica em populações subdivididas de Nei (1973, 1977, 1987), que permite a comparação dos níveis de heterozigosidade entre e dentro das populações, bem como a obtenção de uma estimativa de divergência, a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas de F_{ST} e θ . Esta abordagem deriva-se da fórmula de diversidade gênica média total dada por $H_T = H_S + D_{ST}$, onde H_S é a diversidade gênica média dentro das populações, e D_{ST} é a diversidade gênica média entre as populações, com a diferenciação genética relativa entre populações sendo obtida por $G_{ST} = D_{ST}/H_T$. Os valores médios de H_T e H_S sobre todos os locos foram usados para calcular G_{ST} (Culley et al. 2002). Os cálculos foram realizados através do programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995, 2002).

Utilizou-se o programa **BOTTLENECK 1.2.02** (Piry et al. 1999) para testar se as populações encontram-se em Equilíbrio entre Mutações e Deriva genética, conforme metodologia descrita em Cornuet & Luikart (1996). Estes testes baseiam-se no princípio de que populações que experimentaram uma recente redução de seu tamanho efetivo populacional exibem uma correlacionada redução do número de alelos e da diversidade gênica (H_e , ou heterozigosidade esperada pelas proporções de EHW) nos locos polimórficos. No entanto, o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade (H_e), o que faz com que H_e se torne maior do que a heterozigosidade esperada sob Equilíbrio entre Mutações e Deriva (H_{eq}) porque H_{eq} é calculada a partir do número de alelos (e do tamanho amostral; Cornuet & Luikart 1996, Piry et al. 1999). Ambas as medidas, de heterozigosidade (H_e) e de heterozigosidade esperada de equilíbrio (H_{eq}) referem-se à heterozigosidade senso diversidade gênica de Nei (1987). A heterozigosidade nunca se refere à proporção de heterozigotos observada (H_o). Com isso, não se está testando para um excesso de heterozigotos ($H_o > H_e$) e sim para um excesso de heterozigosidade ($H_e > H_{eq}$). Estritamente falando, esse excesso de diversidade gênica tem sido demonstrado apenas para locos que evoluem sob o Modelo de Mutações de Infinitos Alelos (Kimura & Crow 1964), por Maruyama & Fuerst (1985). Se o loco evoluir sob o Modelo de “Passos de Mutações” (*stepwise mutation model*, Ohta & Kimura 1973), haverá situações em que o excesso de heterozigosidade não será observado (Cornuet & Luikart

1996, Piry et al. 1999). No entanto, poucos locos seguem o Modelo de “Passos de Mutações”, e tão logo os locos desviem desse modelo em direção ao Modelo de Infinitos Alelos, eles exibirão um excesso de heterozigosidade como conseqüência de gargalo populacional. O programa **BOTTLENECK** usa ambos os modelos independentemente, por representarem os dois modelos extremos de mutação ao longo de um continuum de modelos possíveis (Chakraborty & Jin 1992). Todos os locos se adequam a um modelo mutacional em algum lugar entre esses dois modelos extremos. A significância do excesso de diversidade gênica ($H_e > H_{eq}$) foi avaliada através do teste *signed rank* de Wilcoxon, por ser o mais robusto quando utilizado para poucos locos (< 20; Piry et al. 1999), baseando-se em 5.000 replicações.

A estrutura genética hierárquica entre as populações de *Cryptocarya aschersoniana* foi estimada através da distância proposta por Reynolds et al. (1983), a partir do método dos componentes da variância para a estimativa dos coeficientes de coancestralidade de Cockerham (1969, 1973). Nesta, para amostras de tamanhos iguais para duas populações, com as frequências do alelo A_u do loco l sendo \tilde{p}_{1u1} e \tilde{p}_{1u2} , e assumindo-se $F_{ST} = \theta$, o estimador

$$(\hat{\theta} = \frac{\sum_l \left[\frac{1}{2} \sum_u (\tilde{p}_{1u1} - \tilde{p}_{1u2})^2 - \frac{1}{2(2n-1)} [2 - \sum_u (\tilde{p}_{1u1}^2 + \tilde{p}_{1u2}^2)] \right]}{\sum_l (1 - \sum_u \tilde{p}_{1u1} \tilde{p}_{1u2})})$$

fórmula com correção de um erro tipográfico na expressão de Reynolds et al. 1983 envolve explicitamente o tamanho “n” da amostra (Weir 1996). O coeficiente de coancestralidade é apropriado para refletir o grau de distância genética entre populações apenas nos casos em que a divergência foi devida à deriva, não exigindo pressupostos sobre a população ancestral, com amplitude de 0 a 1 (Weir 1996, Dias 1998).

O dendrograma foi plotado, utilizando-se o método de agrupamento de médias das distâncias (UPGMA), tal qual descrito por Sneath & Sokal (1973). O programa **TFPGA 1.3** (Miller 1997) foi usado para gerar o dendrograma, e para checar sua confiança e a consistência de cada nó gerado pelo conjunto original de dados, através de reamostragem *bootstrapping* sobre os locos. O programa **NTSYS-Pc 1.70** (Rohlf 1992) foi empregado para gerar a matriz dos valores cofenéticos e para testar a adequação da análise de agrupamento aos dados originais, através de um teste de Mantel (1967), conforme Manly (1985).

Resultados

A **tabela 1** apresenta os resultados das estatísticas G (Nei 1987) da diversidade em populações subdivididas de *Cryptocarya aschersoniana*. Observa-se que a diversidade gênica total (H_T), que é essencialmente a heterozigosidade esperada, quando as populações são agrupadas e de cruzamentos aleatórios, foi 0,552 e o coeficiente de

diferenciação gênica (G_{ST}') foi 0,340. Por sua vez, a diversidade gênica dentro das populações ($H_S = 0,365$) foi responsável por 66,12% da diversidade gênica total, indicando a existência de uma maior variabilidade ocorrendo dentro das populações do que entre as mesmas.

Pelos testes de adequação aos modelos de Mutação de Infinitos Alelos e de “Passos de Mutação” (tabela 2) (Cornuet & Luikart 1996, Luikart & Cornuet 1998, Piry et al. 1999), a rigor nenhuma população mostrou-se em equilíbrio, indicando ocorrência de gargalos populacionais (*bottle-necks*). No entanto, a partir de uma análise similar realizada

Tabela 1: Estimativas das estatísticas G (Nei 1987) de 12 populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez

| Locos | H_0 | \hat{H}_S | \hat{H}_T | \hat{D}_{ST} | \hat{D}_{ST}' | \hat{H}_T' | \hat{G}_{ST} | \hat{G}_{ST}' | \hat{G}_{IS} |
|-----------------|-------|-------------|-------------|----------------|-----------------|--------------|----------------|-----------------|----------------|
| Acp-1 | 0,325 | 0,420 | 0,491 | 0,072 | 0,078 | 0,498 | 0,146 | 0,157 | 0,227 |
| Acp-2 | 0,108 | 0,323 | 0,501 | 0,177 | 0,193 | 0,517 | 0,354 | 0,374 | 0,666 |
| Acp-3 | 0,197 | 0,265 | 0,502 | 0,237 | 0,266 | 0,531 | 0,472 | 0,501 | 0,256 |
| Alp-1 | 0,146 | 0,511 | 0,625 | 0,115 | 0,125 | 0,636 | 0,183 | 0,197 | 0,715 |
| Alp-2 | 0,437 | 0,463 | 0,621 | 0,158 | 0,172 | 0,635 | 0,254 | 0,271 | 0,058 |
| Cat-1 | 0,043 | 0,193 | 0,381 | 0,189 | 0,206 | 0,398 | 0,495 | 0,517 | 0,778 |
| Cat-2 | 0,650 | 0,450 | 0,657 | 0,207 | 0,242 | 0,691 | 0,316 | 0,350 | -0,447 |
| Cat-1 | 0,071 | 0,327 | 0,663 | 0,336 | 0,367 | 0,694 | 0,507 | 0,529 | 0,782 |
| Cat-2 | 0,510 | 0,458 | 0,489 | 0,031 | 0,034 | 0,491 | 0,063 | 0,068 | -0,113 |
| Cat-3 | 0,179 | 0,416 | 0,550 | 0,134 | 0,147 | 0,563 | 0,243 | 0,261 | 0,569 |
| Dia-1 | 0,187 | 0,397 | 0,741 | 0,344 | 0,375 | 0,772 | 0,465 | 0,486 | 0,530 |
| Dia-2 | 0,462 | 0,367 | 0,499 | 0,133 | 0,145 | 0,511 | 0,265 | 0,283 | -0,259 |
| Dia-3 | 0,250 | 0,393 | 0,588 | 0,195 | 0,213 | 0,606 | 0,331 | 0,351 | 0,364 |
| α -Est-1 | 0,016 | 0,195 | 0,467 | 0,273 | 0,297 | 0,492 | 0,584 | 0,605 | 0,918 |
| β -Est-1 | 0,019 | 0,066 | 0,352 | 0,285 | 0,311 | 0,378 | 0,811 | 0,824 | 0,718 |
| Gdh | 0,101 | 0,487 | 0,575 | 0,088 | 0,096 | 0,583 | 0,154 | 0,165 | 0,793 |
| Got | 0,144 | 0,229 | 0,583 | 0,354 | 0,386 | 0,615 | 0,607 | 0,627 | 0,370 |
| Idh | 0,436 | 0,428 | 0,608 | 0,180 | 0,197 | 0,625 | 0,296 | 0,315 | -0,019 |
| Mdh-1 | 0,821 | 0,545 | 0,721 | 0,176 | 0,192 | 0,737 | 0,244 | 0,260 | -0,506 |
| Mdh-2 | 0,186 | 0,173 | 0,523 | 0,350 | 0,382 | 0,555 | 0,670 | 0,689 | -0,079 |
| Nadh | 0,475 | 0,494 | 0,638 | 0,144 | 0,157 | 0,651 | 0,226 | 0,241 | 0,039 |
| Nadphdh | 0,414 | 0,325 | 0,486 | 0,161 | 0,176 | 0,501 | 0,331 | 0,351 | -0,273 |
| 6Pgdh-1 | 0,078 | 0,129 | 0,409 | 0,280 | 0,306 | 0,434 | 0,685 | 0,704 | 0,397 |
| 6Pgdh-2 | 0,537 | 0,468 | 0,488 | 0,021 | 0,023 | 0,490 | 0,042 | 0,046 | -0,148 |
| 6Pgdh-3 | 0,000 | 0,180 | 0,401 | 0,220 | 0,240 | 0,421 | 0,550 | 0,571 | 1,000 |
| Pgi-1 | 0,870 | 0,607 | 0,731 | 0,124 | 0,135 | 0,742 | 0,169 | 0,182 | -0,433 |
| Pgi-2 | 0,957 | 0,576 | 0,743 | 0,167 | 0,182 | 0,758 | 0,225 | 0,240 | -0,662 |
| Ppo-1 | 0,538 | 0,556 | 0,643 | 0,086 | 0,094 | 0,651 | 0,135 | 0,145 | 0,033 |
| Ppo-2 | 0,085 | 0,136 | 0,273 | 0,137 | 0,149 | 0,285 | 0,501 | 0,523 | 0,373 |
| Prx-1 | 0,106 | 0,291 | 0,443 | 0,152 | 0,166 | 0,457 | 0,343 | 0,362 | 0,636 |
| Prx-2 | 0,731 | 0,479 | 0,500 | 0,021 | 0,023 | 0,502 | 0,043 | 0,047 | -0,526 |
| Prx-3 | 0,200 | 0,369 | 0,616 | 0,247 | 0,296 | 0,665 | 0,401 | 0,445 | 0,458 |
| Prx-4 | 0,108 | 0,520 | 0,637 | 0,117 | 0,128 | 0,648 | 0,184 | 0,198 | 0,793 |
| Prx-5 | 0,163 | 0,187 | 0,331 | 0,144 | 0,158 | 0,344 | 0,436 | 0,457 | 0,129 |
| Skdh-1 | 0,705 | 0,422 | 0,460 | 0,038 | 0,042 | 0,464 | 0,083 | 0,090 | -0,670 |
| Skdh-2 | 0,101 | 0,211 | 0,320 | 0,109 | 0,120 | 0,331 | 0,341 | 0,363 | 0,521 |
| Sod-1 | 0,127 | 0,235 | 0,498 | 0,263 | 0,287 | 0,522 | 0,528 | 0,550 | 0,458 |
| Sod-2 | 0,721 | 0,510 | 0,591 | 0,081 | 0,089 | 0,599 | 0,138 | 0,148 | -0,413 |
| Sod-3 | 0,423 | 0,419 | 0,576 | 0,157 | 0,171 | 0,590 | 0,272 | 0,290 | -0,010 |
| Total | 0,324 | 0,365 | 0,536 | 0,172 | 0,188 | 0,552 | 0,320 | 0,340 | 0,112 |

H_0 = proporção observada de heterozigotos; H_S = diversidade gênica dentro das amostras; H_T = diversidade gênica total; D_{ST} = diversidade gênica entre as amostras, dependente do número de amostras; D_{ST}' = diversidade gênica entre as amostras, independente do número de amostras; H_T' = diversidade gênica total, independente do número de amostras; G_{ST} = estimador do parâmetro F_{ST} , sendo G_{ST}' o estimador equivalente, independente do número de amostras; G_{IS} = estimador de F_{IS} .

Tabela 2: Testes estatísticos não-paramétricos gerados pelo programa [BOTTLENECK 1.2.02](#) (Piry et al. 1999), para a determinação se populações de *Cryptocarya aschersoniana* Mez exibem número significativo de locos com excesso de heterozigosidade, sob os modelos de Mutação de Infinitos Alelos (MIA) e de "Passos de Mutação" (PM).

| População | Teste do Sinal | | | | Teste de Diferenças Padronizadas | | | | Teste de Wilcoxon* | | | | | |
|------------|----------------|---------|---------|--------|----------------------------------|---------|---------|--------|--------------------|--------|------|--------|--------|--------|
| | MIA | | PM | | MIA | | PM | | MIA | PM | | | | |
| | N* | Déficit | Excesso | P* | N | Déficit | Excesso | P | T2 | P | T2 | P | P | P |
| SP | 13,38 | 8 | 21 | 0,0037 | 14,79 | 10 | 19 | 0,0828 | 3,43 | 0,0003 | 1,83 | 0,0338 | 0,0015 | 0,0459 |
| SG | 14,20 | 11 | 20 | 0,0275 | 16,25 | 14 | 17 | 0,4652 | 3,46 | 0,0002 | 1,38 | 0,0842 | 0,0007 | 0,0626 |
| MM | 16,97 | 10 | 26 | 0,0019 | 18,85 | 14 | 22 | 0,1873 | 3,77 | 0,0000 | 1,63 | 0,0512 | 0,0002 | 0,0036 |
| I | 12,99 | 9 | 18 | 0,0383 | 13,99 | 12 | 15 | 0,4229 | 2,61 | 0,0045 | 0,48 | 0,3161 | 0,0107 | 0,2423 |
| MA | 13,98 | 5 | 25 | 0,0000 | 16,07 | 5 | 25 | 0,0006 | 4,59 | 0,0000 | 2,67 | 0,0038 | 0,0000 | 0,0087 |
| BR | 15,67 | 1 | 33 | 0,0000 | 17,44 | 2 | 32 | 0,0000 | 7,38 | 0,0000 | 5,51 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| FC | 15,28 | 7 | 27 | 0,0000 | 17,60 | 8 | 26 | 0,0026 | 5,98 | 0,0000 | 3,94 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0002 |
| SSP | 14,00 | 4 | 26 | 0,0000 | 15,85 | 6 | 24 | 0,0018 | 5,95 | 0,0000 | 3,96 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0001 |
| BA | 14,21 | 2 | 30 | 0,0000 | 16,09 | 6 | 26 | 0,0003 | 5,73 | 0,0000 | 3,97 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| SJ | 14,58 | 5 | 25 | 0,0000 | 15,71 | 7 | 23 | 0,0053 | 4,68 | 0,0000 | 3,14 | 0,0008 | 0,0000 | 0,0046 |
| BI | 15,73 | 2 | 31 | 0,0000 | 17,63 | 3 | 30 | 0,0000 | 6,16 | 0,0000 | 4,17 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| BJ | 13,10 | 5 | 23 | 0,0001 | 15,30 | 5 | 23 | 0,0022 | 4,90 | 0,0000 | 3,38 | 0,0003 | 0,0000 | 0,0010 |

* teste unicaudal para excesso de heterozigosidade

N* número esperado de locos com excesso de heterozigosidade sob o modelo, seguido pelos respectivos números de locos com déficit e excesso de heterozigosidade

P* probabilidade

ou um déficit de diversidade gênica. No entanto, em populações que sofreram deriva recentemente, a maioria dos locos exibirá um excesso de heterozigosidade (Luikart & Cornuet 1998), situação que se apresentou para as populações aqui analisadas de *C. aschersoniana*. Assim, em uma população recentemente reduzida, a diversidade gênica observada será maior do que a diversidade gênica de equilíbrio. Para o presente estudo, o uso de isoenzimas, que é um marcador com taxas de mutação relativamente lentas, conseqüentemente detecta os gargalos ou efeitos de fundador mais remotos, do que poderia ser detectado por microsátélites, p. ex., que evoluem rapidamente. De qualquer forma, um excesso de heterozigosidade (com poucos alelos) poderia ser promovido, também, por seleção balanceadora, que causaria este excesso de heterozigosidade na ausência de deriva genética. No entanto, é improvável que a seleção balanceadora afete a maioria dos locos isoenzimáticos e, com isto, cause um excesso significativo de heterozigosidade em uma grande amostragem de locos, como apontado por Cornuet & Luikart (1996) e Piry et al. (1999). Além disto, os locos com altos valores de F_{ST} ($\cong G_{ST}$) podem ser gerados por seleção disruptiva, sendo necessário ter em mente a possibilidade das frequências sem informação filogenética (as que resultam de seleção) poderem ser justamente as que mais influem na análise (Meyer 1996). Luikart et al. (1998), reiterando os pressupostos apresentados por Cornuet & Luikart (1996), sugeriram que a inclusão de locos com desvios do EHW poderiam causar violações. Assim sendo, a análise aqui feita apenas com os locos em EHW, indicou que as populações SP e SSP se encontram em Equilíbrio de Mutação e Deriva. Isto sugere, como apontado por Lee et al. (2002), que a inclusão de locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg possam fazer com que populações sem ocorrência de gargalos populacionais pareçam tê-los experienciado recentemente.

A identificação de populações submetidas a gargalos recentes é importante porque as mesmas podem não ter tido o tempo necessário de se adaptarem aos problemas freqüentemente causados pelo tamanho populacional reduzido e, conseqüentemente, podem ter um alto risco de extinção (Lee et al. 2002). Quanto antes se detectar um gargalo, maior a probabilidade de que efeitos deletérios do mesmo possam ser evitados ou minimizados através de procedimentos mitigadores de manejo, tais quais o enriquecimento de hábitat ou introdução de imigrantes (Luikart et al. 1998). Como a presente fragmentação das populações de *C. aschersoniana* encontra-se em estado praticamente irreversível, a introdução de imigrantes poderia ser uma opção plausível e exequível, especialmente nas populações menores que estariam sujeitas, teoricamente, a perdas mais rápidas de variabilidade genética devido à deriva (vide Wright 1969).

Para o uso adequado das distâncias genéticas, deve-se levar em consideração os modelos genéticos subjacentes

às mesmas. Dentre as várias distâncias genéticas propostas, a distância genética de Nei (1972) foi a mais utilizada (Weir 1996). No entanto, a distância de Nei é apropriada para estudos de evolução de longo termo, com as populações divergindo devido à deriva e mutação, sendo mais adequada para estudos de separação em nível específico (onde ocorrem substituições gênicas em seqüências codificantes) do que em nível populacional (onde a maior parte da variação de frequências gênicas resulta de deriva) (Nei 1987, Meyer 1996). Com isto, para as populações de *C. aschersoniana*, por não se encontrarem em Equilíbrio de Mutação e Deriva, o uso da distância de Nei torna-se inapropriado.

Por outro lado, como indicado por Felsenstein (1985, 2002), para a distância de coancestralidade, o modelo genético não assume mutação, sendo que as mudanças nas frequências gênicas ocorrem apenas por deriva. Adicionalmente, não assume que os tamanhos populacionais permanecem constantes e iguais em todas as populações. Eles se adequariam com as mudanças no tamanho populacional por ter uma esperança que aumentaria linearmente, não com o tempo, mas com a soma sobre o tempo de $1/N_e$, onde N_e é o tamanho efetivo populacional. Desta forma, se o tamanho efetivo populacional dobrasse, a deriva genética ocorreria mais lentamente e a distância genética seria esperada aumentar apenas em metade do tempo. De maneira distinta da distância de Nei, distâncias baseadas em coancestralidade não estimam o número de mutações fixadas em genes desde sua separação.

Observa-se na [figura 1](#), que não houve formação de grupos diretamente relacionados à proximidade geográfica, como regra. Isto reitera os resultados apresentados por [Morales & Derbyshire \(2002\)](#) que mostraram a inadequação do modelo de fluxo gênico de isolamento pela distância para explicar a divergência encontrada entre estas populações. Pelos testes de associação de matrizes, tem-se que o coeficiente de correlação cofenética foi $r = 0,759$, indicando que o dendrograma gerado não apresentou um bom ajuste (representação simplificada da matriz de similaridade), o que de acordo com Bussab et al. (1990) deveria ser superior a 0,8. No entanto, segundo Nei (1987), por essa correlação ser muito próxima de 1,0 na maioria das árvores obtidas a partir de dados moleculares, seu poder de discriminação não é muito satisfatório.

Como as medidas de coancestralidade (ou F_{ST}) são variâncias que estimam o nível de fragmentação da população, quanto maior o tempo de separação de pares de populações, maior será a variação das frequências gênicas entre as populações (e conseqüentemente uma maior distância) (Meyer 1996). Ainda, como o valor de F_{ST} (ou da distância de Reynolds) é determinado também pelo tamanho efetivo das populações (N_e) em comparação, além do tempo decorrido desde sua divergência, as variações em N_e levam a diferenças na taxa de diferenciação por deriva, uma vez que esse processo resulta de erros amostrais. As distâncias

baseadas em F_{ST} , portanto, estão relacionadas linearmente com o tempo e inversamente ao tamanho efetivo populacional (Reynolds et al. 1983). Com isto, os locos que apresentam frequências semelhantes em diferentes populações apresentam baixos valores de F_{ST} , enquanto que aqueles com frequências muito distintas entre populações apresentam valores altos (se aproximando de 1 à medida que as populações se aproximam da fixação de alelos distintos para um loco; Meyer 1996).

Um elevado valor de distância pode se originar, p. ex., devido à ocorrência de um gargalo populacional. Isto, de acordo com Meyer (1996), seria intuitivo, pois tais afunilamentos aumentariam as taxas de deriva, levando a uma maior diferenciação das frequências gênicas nas populações. Esse alto valor de distância pode, erroneamente, ser interpretado como evidência para um grande tempo de separação entre populações, sendo que se deveria evitar em estudos evolutivos a amostragem de populações cujas frequências gênicas tenham sido alteradas por gargalos populacionais. A ocorrência de gargalos populacionais promove uma grande divergência entre a população que o sofreu e as demais. Esta maior divergência é observada nas frequências gênicas e refletida nas distâncias genéticas. Uma vez que a distância genética de coancestralidade expressa conjuntamente tanto o tempo de separação entre as populações como a variação do tamanho efetivo populacional, esses dois valores ficam indissociáveis. Conseqüentemente a amostragem de uma população que tenha experienciado um gargalo populacional pode levar a uma falsa inferência de grande tempo de separação entre esta e as demais (como observado para a população SP, p. ex.). Uma maneira de se inferir as frequências gênicas de populações, de modo a anular o efeito de gargalos, seria amostrar o maior número possível de sub-populações e então calcular a frequência gênica para o conjunto total. Esse procedimento permitiria a inferência de frequências gênicas livres dos efeitos de deriva (Meyer 1996). A justificativa para essa abordagem se baseia em um aspecto básico da teoria da deriva em que a probabilidade de fixação de um alelo é determinada pela sua frequência na população inicial (Hartl & Clark 1989). Conseqüentemente, o número de alelos fixados no conjunto de sub-populações reflète a sua frequência inicial quando essas sub-populações constituíam uma população única; (porém, vide Meyer (1996) para as críticas apresentadas).

As frequências de diferentes locos variam de maneira distinta, devido à natureza aleatória do processo de deriva. Desta forma, mesmo que todos os genes tenham sido transmitidos através das mesmas populações, as mudanças de frequência gênica (que constituem a informação fundamental para os estudos evolutivos) podem variar entre os locos. Dentre as frequências gênicas haverá um componente “não filogenético”, ou seja, variação que não se correlaciona a relações evolutivas (p. ex., populações pouco aparentadas

apresentando frequências gênicas mais semelhantes do que populações intimamente aparentadas) (Meyer 1996).

A solução a ser adotada frente a este problema seria a utilização de um grande número de locos (Meyer 1996). Supõe-se que esta abordagem permite que as variações “idiossincráticas” sejam diluídas num conjunto maior de informações que inclui frequências gênicas que realmente espelham relações evolutivas. As variações “idiossincráticas”, não filogenéticas, podem resultar da ação de seleção natural.

Apesar das restrições elucidadas para o adequado uso de distâncias genéticas no estudo de genética de populações, conclui-se que a conservação de todas as populações analisadas de *C. aschersoniana* é importante, dadas às altas divergências genéticas encontradas, reiterando as indicações obtidas e apontadas por Moraes & Derbyshire (2002), a partir dos tamanhos efetivos populacionais, bem como pelos níveis de variabilidade detectados poderem estar diretamente relacionados à adaptação (Milligan et al. 1994, David 1998). Ainda, para a preservação das pequenas populações remanescentes do processo de fragmentação florestal, o manejo através da introdução de indivíduos geneticamente diferentes, provenientes de outras populações, poderia ser uma prática a ser adotada para amenizar os efeitos negativos da deriva genética, aqui detectada para a maior parte das populações analisadas.

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica, Prefeitura Municipal de Campinas, Fundação José Pedro de Oliveira, Sr. José Carlos Reis de Magalhães, Sr. Djalma Brasil Zabeu, pelas respectivas autorizações de coleta na Fazenda Campininha, nos “Bosques” do município, na Mata de Santa Genebra, na Fazenda Barreiro Rico, e na Fazenda Palmital. Ao Angelo Gilberto Manzatto e Antonio Carlos Scutti, pela logística e auxílio nas coletas na Fazenda São José e na região do sul de Minas Gerais, respectivamente. Ao Fernando Henrique Romano e Mariana Campanholi Daher pelo auxílio nas análises de laboratório.

Referências bibliográficas

- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Universidade Federal de Viçosa, Impr. Univ., Viçosa.
- ASHTON, P.S. 1981. Techniques for the identification and conservation of threatened species in tropical forests. In *The biological aspects of rare plant conservation* (Synge, H., ed.). John Wiley & Sons, New York, p.155-164.

- BATISTA, F., BAÑARES, A., CAUJAPÉ-CASTELLS, J., CARQUÉ, E., MARRERO-GÓMEZ, M. & SOSA, P.A. 2001. Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary Islands: intraspecific and interspecific comparisons and implications for genetic conservation. *Am. J. Bot.* 88:1582-1592.
- BUSSAB, W.O., MIAZAKI, E.S. & ANDRADE, D.F. 1990. Introdução à análise de agrupamentos. In Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, 9, São Paulo, 1990. Associação Brasileira de Estatística, São Paulo.
- CHAKRABORTY, R. & JIN, L. 1992. Heterozygote deficiency, population substructure and their implications in DNA fingerprinting. *Hum. Genet.* 88:267-272.
- CHASE, M.R., BOSHIER, D.H. & BAWA, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. *Am. J. Bot.* 82:468-475.
- CLEMENT, C.R., ARADHYA, M.K. & MANSHARDT, R.M. 1997. Allozyme variation in spineless pejbaye (*Bactris gasipaes* Palmae). *Econ. Bot.* 51:149-157.
- COCKERHAM, C.C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23:72-84.
- COCKERHAM, C.C. 1973. Analyses of gene frequencies. *Genetics* 74:679-700.
- 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.
- CULLEY, T.M., WALLACE, L.E., GENGLER-NOWAK, K.M. & CRAWFORD, D.J. 2002. A comparison of two methods of calculating G_{ST} , a genetic measure of population differentiation. *Am. J. Bot.* 89:460-465.
- DIAS, L.A.S. 1998. Análises multidimensionais. In Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos (A.C. Alfenas, ed.). Editora UFV, Viçosa, p.405-475.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Phylogenies from gene frequencies: a statistical problem. *Syst. Zool.* 34:300-311.
- FELSENSTEIN, J. 2002. PHYLIP: Phylogeny Inference Package version 3.6a3. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/phylip36.html>)
- GOUDET, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *J. Hered.* 86:485-486.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- HALL, P., ORRELL, L.C. & BAWA, K.S. 1994. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Am. J. Bot.* 81:1104-1111.
- HALL, P., WALKER, S. & BAWA, K.S. 1996. Effects of forest fragmentation on diversity and mating systems in a tropical tree *Pithecellobium elegans*. *Conserv. Biol.* 10:757-768.
- HARTL, D.L. & CLARK, A.G. 1989. Principles of population genetics. 2nd. ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- KIMURA, M. & CROW, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
- LEE, S.-L., NG, K.K.-S., SAW, L.-G., NORWATI, A., SALWANA, M.H.S., LEE, C.-T. & NORWATI, M. 2002. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. *Am. J. Bot.* 89:447-459.
- LIENGSIRI, C., YEH, F.C. & BOYLE, T.J.B. 1995. Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. in Thailand. *For. Ecol. Manage.* 74:13-22.
- LOVELESS, M.D. 1992. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New For.* 6:67-94.
- LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. 1987. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. *Rev. Biol. Trop.* 35:165-175.
- LOVELESS, M.D., HAMRICK, J.L. & FOSTER, R.B. 1998. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity* 81:134-143.
- LUIKART, G., ALLENDORF, F.W., CORNUET, J.-M. & SHERWIN, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89:238-247.
- LUIKART, G. & CORNUET, J.-M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv. Biol.* 12:228-237.
- MANLY, B.F.J. 1985. The statistics of natural selection on animal populations. Chapman and Hall, London.
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220.
- MARSHALL, D.R. & BROWN, A.H.D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In Crop genetic resources for today and tomorrow (Frankel, O.H. & Hawkes, J.G., eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p.53-80.
- MARUYAMA, T. & FUERST, P.A. 1985. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics* 111:675-689.

- MEYER, D. 1996. Árvores evolutivas humanas - uma discussão sobre inferência filogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Série Monografias no. 3, Ribeirão Preto, p. 1-162.
- MILLER, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. (<http://bioweb.usu.edu/mpmbio/tfpga.htm>)
- MILLIGAN, B.G., LEEBENS-MACK, J. & STRAND, A.E. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Mol. Ecol.* 3:423-435.
- MORAES, P.L.R. & DERBYSHIRE, M.T.V.C. 2002. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. *Biota Neotropica* 2: 19p. (<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/fullpaper?bn02402022002+pt>)
- MORAES, P.L.R. & MONTEIRO, R. 2002. Taxas de cruzamento em uma população natural de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). *Biota Neotropica* 2: 10p. (<http://www.biotaneotropica.cria.org.br/v2n2/pt/fullpaper?bn01102022002+pt>)
- MORAES, P.L.R., MONTEIRO, R. & VENCOSKY, R. 2002. Genetic differentiation and diversity of natural populations of *Cryptocarya* spp. (Lauraceae) from the Brazilian Atlantic rain forest. *Lundiana* 3:99-109.
- MYERS, N. 1988. Threatened biota: hotspots in tropical forests. *Environmentalist* 8:1-20.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 70:3321-3323.
- NEI, M. 1977. *F*-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41:225-233.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- OHTA, T. & KIMURA, M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res. Camb.* 22:201-204.
- PIRY, S., LUIKART, G. & CORNUET, J.-M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90:502-503.
- REYNOLDS, J., WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767-779.
- ROHLF, F.J. 1992. *NTSYS: numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Publishers, New York.
- SCANDALIOS, J.G. 1965. Genetic isozyme variations in *Zea mays*. University of Hawaii, Honolulu. (PhD Thesis).
- SCHIERENBECK, K.A., SKUPSKI, M., LIEBERMAN, D. & LIEBERMAN, M. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Mol. Ecol.* 6:137-144.
- SEOANE, C.E.S., KAGEYAMA, P.Y. & SEBBENN, A.M. 2000. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). *Scient. Forest.* 57:123-139. (<http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr57/cap09.pdf>)
- SIMBERLOFF, D. 1986. Are we on the verge of a mass extinction in Tropical rain forests? In *Dynamics of extinction* (Elliott, D.K., ed.). John Wiley & Sons, New York, p.165-180.
- SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- SOULÉ, M.E. 1980. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective* (Soulé, M.E. & Wilcox, B.A., eds.). Sinauer Associates, Sunderland, p.151-169.
- WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. 1990. Genetics of plant isozymes. In *Isozymes in plant biology* (Soltis, D.E. & Soltis, P.S., eds.). Chapman and Hall, London, p.46-72.
- WEIR, B.S. 1996. *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Sunderland.
- WHITMORE, T.C. 1980. The conservation of tropical rain forest. In *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective* (Soulé, M.E. & Wilcox, B.A., eds.). Sinauer Associates, Sunderland, p.303-318.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.
- WRIGHT, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations. v.2. The theory of gene frequencies*. The University of Chicago Press, Chicago.
- YOUNG, A., BOYLE, T. & BROWN, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Tr. Ecol. Evol.* 11:413-418.

Título: Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae)

Autores: Moraes, P. L. R. de & Derbyshire, M. T. V. de C.

Biota Neotropica, Vol. 3 (number 1): 2003

<http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01803012003>

Recebido em 19/09/2002 Revisado em 02/04/2003

Publicado em 17/04/2003 - ISSN 1676-0603