

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS E AMBIENTAIS



DISTRIBUIÇÃO NATURAL, NICHOS ECOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DA  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Trema micrantha* (L.) Blume

MANAUS – AM  
2019

BRISA FLOR

DISTRIBUIÇÃO NATURAL, NICHOS ECOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DA  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Trema micrantha* (L.) Blume

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais, área de concentração, Silvicultura Tropical.

**Orientadora:** Dr.<sup>a</sup> Maria Teresa Gomes Lopes

MANAUS – AM  
2019

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F632d	Flor, Brisa Distribuição natural, nicho ecológico e caracterização da diversidade genética de <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume / Brisa Flor. 2019
	47 f.: il. color; 31 cm.
	Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes Coorientador: Gabriel Dequigiovanni Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal do Amazonas.
	1. Recuperação de áreas degradadas. 2. Microsatélites. 3. Recursos genéticos. 4. Mudanças climáticas. 5. Nicho ecológico. I. Lopes, Maria Teresa Gomes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## AGRADECIMENTOS

*À minha família, em especial minha mãe Jurema Flor do Nordeste, ao meu pai Theófilo Mussi de Andrade e à minha irmã Nina Flor, pelo apoio e incentivo;*

*Ao Leonardo, pela compreensão, apoio e incentivo nessa jornada científica.*

*À Universidade Federal do Amazonas, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e Ambientais (PPGCIFA);*

*À Capes que concedeu a bolsa de pesquisa para a realização deste trabalho;*

*À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Gomes Lopes pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos transmitidos;*

*Ao professor Dr. Santiago Linorio Ferreyra Ramos pela orientação, transmissão de conhecimentos e apoio;*

*Ao LTBM, do INPA, por auxiliar na pesquisa e experimentos;*

*Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e Ambientais (PPG-CIFA);*

*Ao grupo de laboratório e colegas de turma, em especial à Jennifer Tomaz pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio, motivação, força na bancada, e principalmente pela amizade;*

*A todos que contribuíram de qualquer forma para este e outros trabalhos realizados.*

*AGRADEÇO.*

## RESUMO

A biodiversidade Amazônica está constantemente ameaçada devido à ação antrópica, destacando-se o desflorestamento. Programas de recuperação de áreas degradadas são alternativas potenciais para a reutilização das áreas desflorestadas, além de reduzir a pressão de exploração sobre os remanescentes de florestas nativas. O conhecimento da diversidade genética de uma espécie é importante para o manejo ou para efetuar novos plantios, para realizar adequadamente o extrativismo e também para a conservação e o melhoramento genético. O uso de iniciadores microssatélites específicos para *Trema micrantha* (L.) Blume permite o estudo de diversidade dos indivíduos de uma população e entre populações dessa espécie potencial para reflorestamento na Amazônia visando à conservação e uso dos seus recursos genéticos. O estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética de populações de *T. micrantha* em municípios do Estado do Amazonas utilizando microssatélites e estudar o nicho climático e o impacto de diferentes cenários de mudanças climáticas sobre a distribuição geográfica potencial de *T. micrantha*, utilizando para este fim modelos de nicho ecológico. Foram coletadas 47 plantas de 3 municípios do Amazonas. Foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) 5 locos polimórficos de microssatélite para a espécie. As genotipagens foram obtidas por eletroforese capilar e analisadas pela plataforma R. Foi possível observar, para os locais de amostragem, alta diversidade genética entre os indivíduos dentro de populações naturais de *Trema micrantha* e sua estrutura genética apresenta como uma metapopulação para os locais de estudo. Ressalta-se que novos indivíduos e outros locos microssatélites devem ser analisados para aumentar a amostragem e confirmar dos resultados. A partir dos pontos de *Trema micrantha* observou-se que sua distribuição geográfica no território brasileiro está associada, principalmente, a áreas alteradas em processo de sucessão secundária, e com um caráter tropical. As áreas mais sensíveis à redução da espécie no Brasil a partir de projeções para os períodos de 2020-2050 e 2051-2070 estão concentradas nos biomas Amazônia, Pantanal e Cerrado. As áreas litorâneas dos biomas Caatinga e Mata Atlântica podem ser consideradas como estratégicas para a conservação e manejo sustentável da espécie, uma vez que apresentaram maior adequabilidade climática para *Trema micrantha* e podem funcionar como áreas prioritárias para coleta de sementes para reflorestamentos e para conservação da variabilidade genética da espécie *in situ*.

**Palavras-chave:** Recursos genéticos, variabilidade genética, mudanças climáticas, modelagem ecológica.

## ABSTRACT

Amazonian biodiversity is constantly threatened due to anthropic action, especially deforestation. Degraded land reclamation programs are potential alternatives for the reuse of deforested areas and reduce exploitation pressure on remnants of native forests. Knowledge of the genetic diversity of a species is important for management or for new plantings, to properly extractivism and also for conservation and genetic improvement. The use of specific microsatellite primers for *Trema micrantha* (L.) Blume allows the study of the diversity of individuals of a population and among populations of this potential species for reforestation in the Amazon aiming at the conservation and use of their genetic resources. The objective of this study was to analyze the genetic diversity of *T. micrantha* populations in municipalities of the State of Amazonas using microsatellites and to study the climate niche and the impact of different climate change scenarios on the potential geographic distribution of *T. micrantha*. end ecological niche models. We collected 47 plants from 3 municipalities of Amazonas. Five microsatellite polymorphic loci were amplified by polymerase chain reaction (PCR) for the species. Genotyping was obtained by capillary electrophoresis and analyzed by the R platform. It was possible to observe, for the sampling sites, high genetic diversity among individuals within natural populations of *Trema micrantha* and its genetic structure presents as a metapopulation for the study sites. It is emphasized that new individuals and other microsatellite loci should be analyzed to increase sampling and confirm the results. From the points of *Trema micrantha* it was observed that its geographical distribution in the Brazilian territory is mainly associated with altered areas in the process of secondary succession, and with a tropical character. The most sensitive areas for species reduction in Brazil from projections for the 2020-2050 and 2051-2070 periods are concentrated in the Amazon, Pantanal and Cerrado biomes. The coastal areas of the Caatinga and Mata Atlântica biomes can be considered as strategic for the conservation and sustainable management of the species, since they presented higher climatic suitability for *Trema micrantha* and can function as priority areas for seed collection for reforestation and conservation of variability. genetics of the species in situ.

**Keywords:** Genetic resources, genetic variability, climatic changes, ecological modeling.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ramo de <i>Trema micrantha</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Faces de folha de <i>Trema micrantha</i> .....	15
<b>Figura 3.</b> Detalhes da flor de <i>Trema micrantha</i> .....	15
<b>Figura 4.</b> Frutos de <i>Trema micrantha</i> em diferentes estádios de maturação..	16
<b>Figura 5.</b> Mapa de distribuição de <i>Trema micrantha</i> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 6.</b> Amostragem e coleta de material vegetal da espécie <i>Trema micrantha</i> em áreas de sucessão ecológica com presença de comunidade de espécies pioneiras no estado do Amazonas. ....	21
<b>Figura 7.</b> Valores de $\Delta K$ para cada valor de K obtidas pela análise Bayesiana, considerando todas as populações amostradas. ....	31
<b>Figura 8.</b> Análise da estrutura genética das 47 plantas, amostradas em cinco populações de <i>Trema micrantha</i> , a partir de cinco locos microssatélites .....	31
<b>Figura 9.</b> Dados de ocorrência de <i>Trema micrantha</i> por biomas no Brasil (Modelo Envelope Score). ....	32
<b>Figura 10.</b> Distribuição de <i>Trema micrantha</i> no Brasil por biomas no período atual (Modelo Environmental Distance). ....	33
<b>Figura 11.</b> Distribuição de <i>Trema micrantha</i> no Brasil por biomas no período atual (Modelo Envelope Score). ....	33
<b>Figura 12.</b> Projeção para o período de 2020-2050, no cenário RCP 45, da distribuição de <i>Trema micrantha</i> no Brasil por biomas de acordo com as mudanças climáticas globais (Modelo Envelope Score).....	35
<b>Figura 13.</b> Projeção para 2051-2070, no cenário RCP 45, da distribuição de <i>Trema micrantha</i> no Brasil por biomas de acordo com as mudanças climáticas globais (Modelo Envelope Score). ....	36
<b>Figura 14.</b> Projeção para o período de 2020-2050, no cenário RCP 85, da distribuição de <i>Trema micrantha</i> no Brasil por biomas de acordo com as mudanças climáticas globais (Modelo Envelope Score).....	36
<b>Figura 15.</b> Projeção para o período de 2051-2070, no cenário RCP 85, da distribuição de <i>Trema micrantha</i> no Brasil por biomas de acordo com as mudanças climáticas globais (Modelo Envelope Score).....	37
<b>Figura 16.</b> Área de distribuição (em km <sup>2</sup> ) por bioma de <i>T. micrantha</i> no cenário RCP 45 nos dois períodos (Modelo Environmental Distance).....	38
<b>Figura 17.</b> Área de distribuição (em km <sup>2</sup> ) por bioma de <i>T. micrantha</i> no cenário RCP 85 nos dois períodos (Modelo Environmental Distance).....	39

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação dos locais e datas das coletas de amostras realizadas nas cinco populações de <i>Trema micrantha</i> , no estado do Amazonas.....	22
<b>Tabela 2.</b> Sequências dos iniciadores incluindo nome, motivo, porcentagem de GC, temperaturas de anelamento, tamanhos esperados dos produtos em pares de bases (pb), e classificação de cada iniciador desenvolvido para <i>Trema micrantha</i> .....	23
<b>Tabela 3.</b> Variáveis bioclimáticas selecionadas para uso na modelagem da predição de ocorrência da espécie em estudo, com o código e sua correspondência, variável.....	25
<b>Tabela 4.</b> Índices de diversidade genética ao nível dos locos (iniciadores) de microssatélites obtidos a partir das populações de <i>Trema micrantha</i> coletadas no estado de Amazonas.....	27
<b>Tabela 5.</b> Índices de diversidade genética ao nível das 5 populações, obtidas a partir de 5 locos de microssatélites desenvolvidos para <i>Trema micrantha</i> .....	28
<b>Tabela 6.</b> Resultados das estimativas das estatísticas F de Wright (1951) obtidas para 5 populações de <i>Trema micrantha</i> utilizando 5 locos de microssatélites específicos.....	29
<b>Tabela 7.</b> Comparações do FST par a par entre as cinco populações de <i>Trema micrantha</i> coletadas no estado de Amazonas.....	29
<b>Tabela 8.</b> Análise da variância molecular (AMOVA) realizado para cinco populações de <i>Trema micrantha</i> coletada no estado do Amazonas.....	30
<b>Tabela 9.</b> Área, em quilômetros quadrados, na projeção do cenário RCP 45 para ambos períodos.....	38
<b>Tabela 10.</b> Área, em quilômetros quadrados, na projeção do cenário RCP 85 para ambos períodos. Fonte: Próprio autor.....	39



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Classificação botânica e características da espécie.....	14
3.2 Distribuição Geográfica.....	16
3.3 Uso e importância da espécie.....	16
3.4 Diversidade Genética.....	17
3.5 Marcadores Moleculares.....	18
3.6 Marcadores Moleculares Microssatélites.....	18
3.7 Nicho Ecológico.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Estudo da diversidade e estrutura genética em populações de <i>Trema micrantha</i> no Amazonas.....	21
4.1.1 Área de estudo e local de amostragem.....	21
4.1.2 Extração e quantificação e amplificação dos microssatélites no DNA genômico de <i>Trema micrantha</i> .....	22
4.1.3 Análises estatísticas.....	23
4.2 Desenvolvimento de modelagem ecológica para populações naturais ou distribuição de <i>Trema micrantha</i> .....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Diversidade e estrutura genética em populações de <i>Trema micranta</i> no Amazonas.....	27
5.1.1 Índices de diversidade genética.....	27
5.1.2 Estrutura genética.....	28
5.2 Modelagem ecológica para populações naturais ou distribuição de <i>Trema micrantha</i> .....	31
6. CONCLUSÕES.....	40
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## INTRODUÇÃO

Considerado o maior bioma de floresta tropical do mundo, a Amazônia contém cerca de 50% da biodiversidade do planeta (Vasconcelos, 2015). Entretanto, este bioma vem sendo ameaçado por vários fatores, dentre os quais o principal é o desmatamento causado por um conjunto de atividades antrópicas, tais como: a pecuária extensiva, a agricultura, a construção de estradas, hidrelétricas, mineração, atividades madeireiras e urbanização (Moreira, 2009).

Várias espécies têm sido relatadas como potenciais para recuperação de áreas desflorestadas na Amazônia, dentre elas, destaca-se *Trema micrantha* (L.) Blume, uma espécie florestal nativa do Brasil, pioneira e de crescimento rápido. É encontrada principalmente em solos fortemente alterados, podendo colonizar áreas desmatadas, tornando-se dominante durante os primeiros anos de sucessão (Brokaw, 1987; Denslow, 1987).

A espécie apresenta ampla gama de benefícios, desde uso como matéria prima até a conservação do solo e das condições da floresta. A madeira é usada para construções leves e como lenha. Apresenta uso medicinal, sendo os compostos extraídos de suas folhas, usados no tratamento de erupções oriundas de sarampo, e ainda, amenizando sintomas de diabetes e artrite (Barbera et al., 1992; Nee, 1993; Schoenfelder et al., 2006; Márquez-Cruz et al., 2011). É recomendada para programas de plantios florestais, recuperação de áreas degradadas por mineração e restauração de matas ciliares (Ferreira et al., 1977; Carvalho, 1994; Lorenzi, 2008; Nóbrega et al., 2010).

*Trema micrantha* atrai grande quantidade de espécies essencialmente frugívoras como por espécies onívoras e insetívoras que incluem frutos em sua dieta, sugerindo um amplo e diversificado conjunto de organismos dispersores (Andreani et al., 2014). A espécie é amplamente distribuída na Amazônia, e pode estar sofrendo alterações em suas populações devido ao desmatamento. A redução de populações de uma espécie vegetal como *T. micrantha* pode provocar também riscos de redução de animais que dela se alimentam, devido as conexões diretas das espécies integrantes de um ecossistema.

O desmatamento na Amazônia tem se intensificado devido ao extrativismo ou para ampliar a agropecuária. A redução de áreas de florestas provoca risco de perda de biodiversidade para o planeta em número de indivíduos dentro de cada espécie e em variabilidade genética das populações das espécies alteradas. Para espécies arbóreas, acredita-se que essa perda de variabilidade genética seja causada pelos efeitos de deriva genética, pela diminuição ou perda de fluxo gênico entre populações anteriormente conectadas e devido à endogamia relacionada à redução do tamanho das populações (Ellstrand e Elam, 1993; Koskela e Amaral, 2002). O

impacto desses eventos sobre a diversidade e estrutura genética das populações está diretamente relacionado ao nível de perturbação a que foram submetidos, ao tamanho e ao grau de isolamento dos fragmentos alterados (Boshier e Lamb, 1997).

O conhecimento da diversidade genética de uma espécie é importante para realizar adequadamente o extrativismo, para o manejo ou para efetuar novos plantios, e também para a conservação, domesticação e o melhoramento genético (Esfahani et al., 2009; Setotaw et al., 2010). Informações sobre a diversidade genética entre e dentro de populações naturais em espécies vegetais permite entender como a seleção natural está atuando em função da capacidade de adaptação (Estopa et al., 2006). Analisar a distribuição da diversidade genética nas populações de *T. micrantha* na Amazônia será útil para sua conservação e uso. Este conhecimento ainda nos permite identificar o número e quais matrizes serão alvo de coleta para a constituição de lotes de sementes para uso em programas de reflorestamentos.

Os marcadores moleculares em nível de DNA permitem detectar diferenças genéticas entre indivíduos, medir o grau de polimorfismos em uma ou mais populações, dando resposta a questões importantes para estudos ambientais, abordagens ecológicas e evolutivas (Davey et al., 2011). Entre os marcadores, ressalta-se os microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR, *Sequence Simple Repeats*) que apresentam natureza codominante (Ouborg et al., 2010). Os SSR têm sido muito utilizados a partir de análises de genética de populações para estudos de estrutura e diversidade genética de espécies arbóreas nativas, tais como *Carapa guianensis* (Raposo et al., 2007), *Solanum spp.* (Moura et al., 2009), *Dipteryx alata* (Tarazi et al., 2010).

As informações sobre a distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *T. micrantha* na Amazônia poderá orientar a identificação de populações com variabilidade genética para coleta de sementes para uso em programas de recuperação de áreas degradadas e para a conservação da espécie. Associado ao estudo populacional com marcadores moleculares, outros estudos como distribuição natural, nicho ecológico e projeções de mudanças futuras no ecossistema poderá fazer previsões sobre os riscos de redução de biodiversidade.

Além dos desmatamentos, alterações climáticas também ameaçam a sobrevivência das espécies. À medida que os impactos ambientais causados por mudanças climáticas tornam-se mais aparentes, aumenta-se a necessidade de previsões mais confiáveis sobre como estas mudanças continuarão afetando os ecossistemas (Kurmes et al., 2008). Encontrar maneiras de reduzir a incerteza na previsão sobre a influência de futuras emissões de gases do efeito estufa e do clima nos processos de planejamento de gerenciamento de recursos naturais será essencial para a sustentabilidade ecológica em um clima instável (Trenberth, 2010).

Projeções de mudanças futuras no ecossistema podem ser alcançadas com modelos climáticos baseados em nichos que simulam uma série de processos ecológicos e têm sido utilizados para prever mudanças na biomassa e na produtividade do ecossistema, bem como mudanças na distribuição geográfica de tipos de vegetação, espécies ou zonas ecológicas (Coops and Waring, 2011).

Considerando a relevância ecológica destas previsões para utilização de *T. micrantha* em futuros programas de recuperação de áreas degradadas, o estudo da diversidade genética da espécie associado ao conhecimento de sua potencial distribuição geográfica em diferentes cenários, é uma importante ferramenta para delinear áreas prioritárias para sua conservação e áreas estratégicas para coleta de sementes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Estudar a distribuição natural, nicho ecológico e caracterização da diversidade genética de *Trema micrantha* (L.) Blume.

### **2.2 Específicos**

- Caracterizar a diversidade genética existente entre e dentro das populações estudadas de *T. micrantha* no estado do Amazonas, utilizando marcadores moleculares microssatélites;
- Estudar o nicho climático e o impacto de diferentes cenários de mudanças climáticas sobre a distribuição geográfica potencial de *Trema micrantha* no Brasil.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Classificação botânica e características da espécie

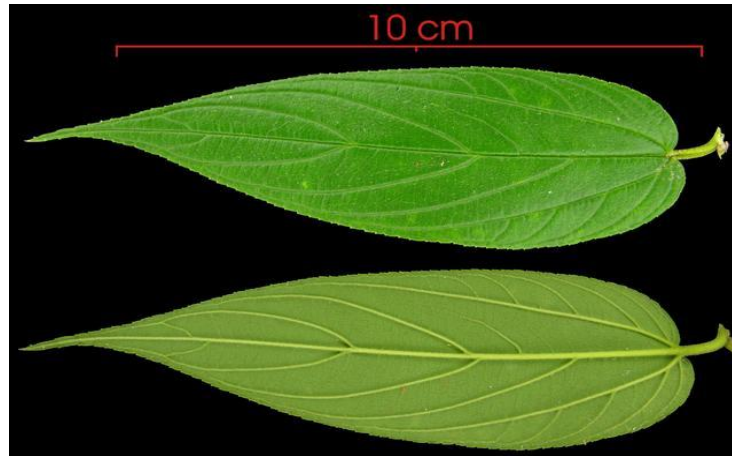
A *Trema micrantha* (L.) Blume é uma espécie arbórea pioneira, pertencente à divisão *Magnoliophyta* (Angiospermae), classe *Magnoliopsidae* (Dicotyledonae), ordem Rosales e família das Cannabaceae. Vulgarmente é conhecida como pau-pólvora, trema, crindiúva, motamba, periquiteiro, seriúva e tamanqueira (Oliveira-Filho et al., 1995; Venturin et al., 2000; Lorenzi, 2008).

É uma árvore neotropical, encontrada em regiões de climas tropical e temperado, de crescimento rápido, podendo chegar a 29 metros de altura. Em regeneração natural e artificial pode chegar a 6 m de altura em 14 meses. É perene, ereta, bastante ramificada, de caule estriado na cor marrom escura e que se propaga por sementes (Ferreira et al., 1977; Carvalho, 1994; Torres, 1996; Lorenzi, 2008; Matos et al., 2011).

Seus galhos são compostos por folhas simples (Figura 1), de consistência fina, com tamanho de 10 a 12 cm, alternadas, pubescentes na face dorsal e ásperas na face ventral, com margem foliar finamente serrada em toda sua extensão e nervuras marcadas (Figura 2) (Carvalho, 1994).



**Figura 1.** Ramo de *Trema micrantha*. Disponível: [www.plantsystematics.org](http://www.plantsystematics.org)



**Figura 2.** Faces de folha de *Trema micrantha*. Disponível: [www.discoverlife.org](http://www.discoverlife.org).

A espécie é classificada como hermafrodita críptica por possuir representantes variando de monóicas a dioicas. É alógama facultativa. Com flores pequenas (Figura 3) unissexuais ou bissexuais andrógenas, possui polinização através do vento e podem ser visitadas por pequenos insetos (Bawa et al., 1985; Torres, 1996).



**Figura 3.** Detalhes da flor de *Trema micrantha*. Disponível: < [www.discoverlife.org](http://www.discoverlife.org). >

Florescem entre setembro e janeiro, podendo se estender ao longo de todo o ano. Suas flores são melíferas, e seu néctar é aproveitado por abelhas nativas na produção do mel (Lorenzi, 2008).

Possui frutos pequenos (0,3 mm) em cachos agarrados aos galhos (Figura 4), carnosos e indeiscentes, tipo drupa, contendo somente uma semente no seu interior, protegida por um endocarpo lenhoso e faveolado, constituindo o pirênio. O fruto é verde-escuro e, quando maduro, apresenta coloração vermelha. Devido à grande quantidade de frutos produzidos, a espécie destaca-se na alimentação da fauna, sendo suas sementes dispersas, por aves, primatas e outros animais (Corner, 1976; Barroso, 1978; Carvalho, 1994).



**Figura 4.** Frutos de *Trema micrantha* em diferentes estádios de maturação. Disponível: [www.discoverlife.org](http://www.discoverlife.org).

### 3.2 Distribuição Geográfica

*Trema micrantha* (L.) Blume é uma espécie pioneira frutífera, nativa do Brasil, ocorre com frequência em fases iniciais da sucessão secundária, geralmente em populações agregadas, com ocorrência no sul dos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul (Backes e Irgang, 2004). Em território brasileiro está distribuída em vários tipos de formações vegetais por Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Lorenzi, 2008). Sua presença é marcante em Floresta Ombrófila Densa (Floresta Amazônica e Floresta Atlântica) e nos Campos Rupestres ou de Altitude (Carvalho, 1994).

### 3.3 Uso e importância da espécie

A espécie é uma das primeiras a se estabelecer em clareiras e áreas abandonadas (Lorenzi 2008; Durigan et al., 2002). Surge de maneira explosiva na floresta, respondendo à simples penetração de luz, permitida a partir de qualquer derrubada, queimada ou outras alterações (Backes e Irgang, 2004).

Árvore pioneira com elevado valor ecológico, com seus frutos sendo bastante consumidos por uma grande diversidade de aves, principalmente por maritacas e Psitacídeos (Oliveira-Filho et al., 1995), também é visitada e conseqüentemente polinizada por melíponas. Além de ser uma das primeiras espécies a se estabelecer em áreas abandonadas por agricultores (Lorenzi, 2008), ou até mesmo em locais minerados de cassiterita e em áreas de dunas, sua ação pioneira é marcante também em ecossistemas não degradados (Kageyama, 1992).

A espécie é indicada para programas de plantios florestais, reconstituição de mata ciliar em locais sem inundação, recuperação de área erodidas e degradadas por mineração e



ainda para estabilização de dunas (Ferreira et al., 1977; Carvalho, 1994; Lorenzi, 2008; Nóbrega et al., 2010). Podendo, então, ser vista como uma espécie bastante resistente à acidez do solo (Furtini Neto et al., 1999) e responsiva ao fósforo no substrato (Paron et al., 1997; Soares et al., 2006). Sua importância silvicultural vem crescendo à medida que espécies pioneiras têm desempenhado relevante função na sucessão secundária, criando condições necessárias ao desenvolvimento de espécies secundárias e clímax.

Seus troncos grossos são usados para armação de paredes, já os troncos mais finos, são utilizados como viga de teto. A madeira é leve e macia ao corte, fraca, de baixa resistência ao apodrecimento. Em outros lugares, é usada como lenha (Márquez-Cruz et al., 2011).

Na medicina popular, uma infusão feita com suas folhas é utilizada para banhar as erupções cutâneas ocasionadas pelo sarampo, pois, seu poder analgésico é quase imediato. Evitando, assim, o aparecimento de novos focos da doença (Nee, 1993; Márquez-Cruz et al., 2011). Também estudada como um agente importante no combate ao diabetes, um grupo de pesquisadores brasileiros descobriram em suas folhas, um extrato bruto de etanol, com efeitos comparados a glibenclamida, que pode reduzir os níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos (Schoenfelder et al., 2006).

### **3.4 Diversidade Genética**

Informações sobre a diversidade genética de uma espécie auxilia nos estudos de conservação e melhoramento genético (Esfahani et al., 2009; Setotaw et al., 2010), o que proporciona um melhor entendimento de como a seleção está atuando em função da adaptabilidade (Estopa et al., 2006).

Estudos de variabilidade genética em populações naturais de plantas em regiões tropicais mostram que estas conservam alta variabilidade dentro das populações, em comparação a outras populações presentes em outros tipos de ambientes que apresentam uma variabilidade menor. Os fatores que influenciam diretamente na distribuição dessa variabilidade genética são: o sistema de cruzamento, o tipo de reprodução das espécies, o tamanho real da população, sua distribuição geográfica e fluxo gênico (Paiva, 1998).

Estudos de melhoramento e conservação genética de espécies arbóreas vêm mostrando uma perda de genes adaptados a determinados ambientes, devido à redução dessas populações naturais, ocasionando altas perdas de variabilidade genética, por deriva genética (Sebbenn e Etori, 2001). Logo, a deriva genética origina a depressão por endogamia, reduzindo a capacidade adaptativa, fertilidade, produtividade, vigor, entre outras

características (Ritland, 1996).

A biodiversidade tem como base a variabilidade genética, que pode ser estudada por meio de marcadores genéticos, que vem se tornando uma importante ferramenta em estudos populacionais de espécies arbóreas (Freitas et al., 2005).

### **3.5 Marcadores Moleculares**

Marcadores moleculares são métodos modernos da biologia molecular que envolvem técnicas bioquímicas e fragmentos da molécula de DNA usados para diferenciar indivíduos geneticamente diferentes (Borém e Miranda, 2009; Caixeta et al., 2009). Somente a partir da década de 80 é que a utilização dos marcadores moleculares ganhou relevância em estudos acerca da variabilidade genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O estudo da variabilidade genética é indispensável para a conservação da biodiversidade, manutenção de amostras representativas e da diversidade de espécies, além de promover oportunidades para a pesquisa científica. Pois, o conhecimento a respeito da genética das espécies florestais é ainda incipiente. Dessa forma, o emprego de pesquisas com os marcadores de DNA permite entre outras coisas, quantificar os níveis de variabilidade genética intrapopulacional, estimar a divergência genética interpopulacional e resolver questões de identificação de genótipos (Alves, 2009; Kirst et al., 2005).

Através do uso de marcadores, os genótipos são avaliados, as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas e as bandas não-comuns, como diferenças. Os resultados são codificados, a fim de gerar uma matriz de similaridade ou dissimilaridade, interpretada por meio de análise de agrupamento ou multivariada. A escolha dos genitores e o planejamento dos cruzamentos são etapas de fundamental importância para o sucesso de um programa de melhoramento. Essas etapas podem ser auxiliadas por marcadores moleculares e fornecem aos melhoristas informações genéticas adicionais e mais detalhadas dos genótipos (Guimarães et al., 2009).

### **3.6 Marcadores Moleculares Microssatélites**

São marcadores denominados de sequências curtas repetidas em *tandem* (STR – *Short Tandem Repeats*) ou mais comumente conhecidos como sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) (Brondani et al., 2007).

São compostos por fragmentos de duas a seis bases nitrogenadas repetidas em

*tandem* como por exemplo, TATATATATATA, frequentemente encontradas no genoma de eucariotos, sendo então utilizados para diferenciá-los. Podem ser classificados segundo os motivos de repetições em *mononucleotídeo*, dinucleotídeo, tetranucleotídeo, pentanucleotídeo e hexanucleotídico. Os dinucleotídeos são as repetições mais frequentes, seguido por mono e tetra e os trinucleotídeos e demais repetições aparecem com menor frequência (Ellegren, 2004). Tais repetições podem ser classificadas em: repetições perfeitas, sem interrupção (CTCTCTCTCTCT), repetições imperfeitas, com interrupção por base não repetida (CTCTCTCATCTCT), repetições compostas, quando duas ou mais repetições se encontram (GTGTGTGTGTATATATAT) (Borém e Miranda, 2009) e ainda, repetições interrompidas, quando uma sequência qualquer entra na repetição (TATATATAGGGGTATA) (Goldstein e Schlotterer, 1999).

Os microssatélites são altamente polimórficos, apresentando um padrão grande de variação no tamanho das repetições, o que pode ter sido ocasionado por um *crossing-over* desigual ou um erro da DNA polimerase no momento da replicação acrescentando conjuntos extras de sequências repetidas (Borém e Miranda, 2009). Como elemento de caracterização e comparação genéticas, os microssatélites constituem um loco genético (fragmento de DNA), bastante variável, multialélico, como uma gama de conteúdo acerca da espécie estudada (Caixeta et al., 2009).

A caracterização da variabilidade genética existente em uma população é uma etapa importante para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético para a espécie. Em estudos populacionais de espécies florestais, o uso de marcadores microssatélites vem representando uma ferramenta de alto potencial, sendo utilizado para estudos de diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética e fluxo gênico de plantas, devido à pequena quantidade de DNA necessária por amostra, à facilidade de detecção por PCR, a facilidade de análise, a herança codominante, o multialelismo, assim como a alta informatividade e abundância no genoma (Powell et al., 1996).

Para o desenvolvimento do microssatélites é necessário construir bibliotecas enriquecidas com regiões do genoma que contenham as sequências simples repetidas, a partir de um *pool* de DNA de uma determinada espécie (Billotte et al., 1999). Quando obtida a biblioteca, as sequências de DNA podem ser obtidas diretamente desta, podendo ser identificadas, isoladas, sequenciadas e desenhados os pares de *primers* das regiões que flanqueiam os locos com sequências microssatélites (Brondani et al., 2007).

### 3.7 Nicho Ecológico

O conceito geral de nicho pode ser delimitado ao que foi chamado de nicho ecológico, onde se refere ao tempo atual em que o organismo se desenvolve e como ele interage com os fatores ambientais circundantes. O nicho ecológico envolve todos os recursos atuais do meio ambiente, as adaptações dos organismos e como esses dois se relacionam (Hutchinson, 1957).

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos vários programas para realizar modelos ecológicos de nicho, convertendo-se em importantes ferramentas para biologia da conservação e ecologia de paisagens (Peterson e Cohoon, 1999). Estes modelos estão embasados no conceito de nicho ecológico de Hutchinson (1957) relacionando a informação ecológica com a ambiental, identificando zonas que não possuem registros anteriores da espécie, obtendo desta forma a área de distribuição potencial destas espécies (Peterson et al., 2002). Estas aplicações vêm sendo utilizadas recentemente para avaliar o impacto provocado pelas mudanças climáticas e de uso de solo, que implicam na transformação da cobertura vegetal original por fatores antrópicos (Velázquez et al., 2002).

Os modelos de nicho ecológico nos proporcionam previsões precisas de ocorrência da espécie, desde que os dados utilizados sejam confiáveis, com o maior número possível de pontos de presença que representem com fidelidade a região em que a espécie ocorre. A decisão de escolha entre os modelos é baseada na comparação entre dados observados e estimados, utilizando índices que medem a diferença entre os modelos (Jiménez-Valverde et al., 2008).

A modelagem do nicho ecológico possibilita a identificação das condições abióticas ideais para sobrevivência da espécie, por meio da sua distribuição se baseia em atributos ambientais, sendo uma importante ferramenta para investigar padrões e processos biogeográficos, possibilitando a previsão da distribuição geográfica de espécies a partir de dados esparsos de ocorrência (Guisan e Thuiller, 2005).

Além dessas previsões, este estudo proporciona a possibilidade de analisar várias questões ecológicas, de evolução e conservação, como definir áreas prioritárias para conservação ou verificar a distribuição geográfica de uma espécie no passado e fazer previsões sobre a sua distribuição futura (Siqueira e Peterson, 2003).

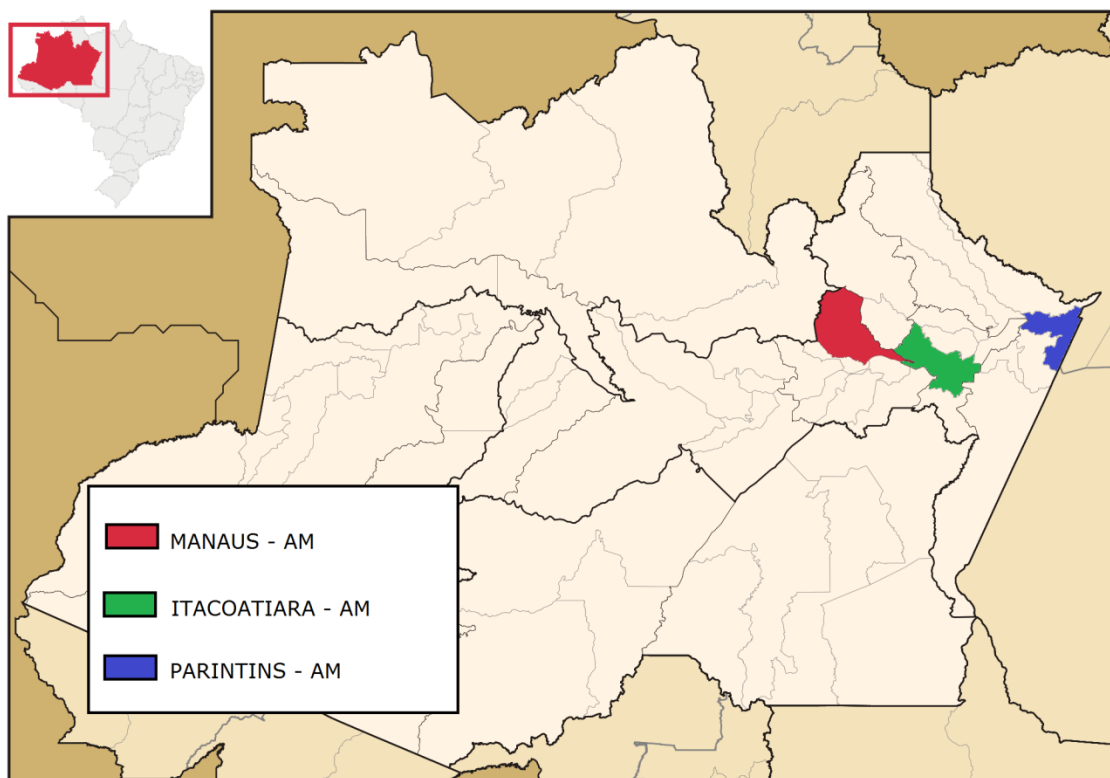
A distribuição espacial das plantas pode ser um dos fatores que influenciam o sistema de acasalamento que, junto com a dispersão do pólen e das sementes, desempenham grande efeito na estrutura espacial da variabilidade genética (Epperson, 2003).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Estudo da diversidade e estrutura genética em populações de *Trema micrantha* no Amazonas

#### 4.1.1 Área de estudo e local de amostragem

Este estudo foi realizado em cinco populações de *T. micrantha* do estado de Amazonas, sendo duas populações de Itacoatiara, uma de Manaus e duas de Parintins. Os municípios estão localizados nas margens de diferentes bacias hidrográficas (Figura 6) e foram selecionados pela logística de coleta. Cada local de coleta/amostragem foi denominado de população. Em cada local de amostragem foi identificado uma área de sucessão ecológica com presença de comunidade de espécies pioneiras, sendo que a *T. micrantha* é classificada como uma espécie deste grupo sucessional (Lorenzi, 2008). Em cada uma das cinco populações foram coletadas amostras que variaram entre 5 a 15 plantas, totalizando 47 amostras (Tabela 1).



**Figura 5.** Amostragem e coleta de material vegetal da espécie *Trema micrantha* em áreas de sucessão ecológica com presença de comunidade de espécies pioneiras no estado do Amazonas.

**Tabela 1.** Identificação dos locais e datas das coletas de amostras realizadas nas cinco populações de *Trema micrantha*, no estado do Amazonas.

Município	Pontos de referência	Número de Amostras Coletadas
Parintins (AM)	Estrada do Aeroporto	8
Parintins (AM)	Comunidade Nossa Senhora de Fátima	10
Itacoatiara (AM)	Estrada do Aeroporto	5
Itacoatiara (AM)	Comunidade São João	14
Manaus (AM)	Campus da UFAM - Setor Sul	10

Esta dissertação está cadastrada no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, que regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015.

De todas as amostras nas populações foram coletadas de 4 a 5 folhas, as quais foram armazenadas em um saco plástico tipo *zip lock* previamente identificado, contendo sílica gel, até que pudesse ser transportado e conservado a -200C no Laboratório de Melhoramento Vegetal (LMV - UFAM).

#### **4.1.2 Extração e quantificação e amplificação dos microssatélites no DNA genômico de *Trema micrantha*.**

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo do detergente catiônico CTAB 2X (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) descrito por Doyle e Doyle (1990) e logo quantificado. Foram utilizados cinco locos de microssatélites desenvolvidos para *T. micrantha* por Quémel (2015) (Tmi 04, Tmi 16, Tmi 17, Tmi 26 e Tmi 36) (Tabela 2). Estes microssatélites foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando o termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) Usar o termociclador do lab. em um volume total de 10 µL por reação, contendo 10 ng de DNA genômico, 1X buffer, 210 µM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16 µM de primer forward e calda M13 (FAM ou NED) (Schuelke, 2000), 0,32 µM de primer reverse, 1,05 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 3,49 µL de água ultra pura. Estas amplificações via PCR foram desenvolvidas em duas etapas, a primeira etapa para os iniciadores e a segunda para realizar a ligação do M13. Os produtos de amplificação foram verificados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% corado com GelRed (Biotium) em 1 × tampão TBE (pH 8,0). Os produtos amplificados da PCR foram submetidos a um analisador automático de DNA por eletroforese capilar ABI 3130XL no Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O GeneScan™-500 ROX® tamanho padrão (Life Technologies do Brasil Ltda.) foi usado para determinar o tamanho dos

alelos. Os fragmentos amplificados foram observados e analisados com o software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

**Tabela 2.** Sequências dos iniciadores incluindo nome, motivo, porcentagem de GC, temperaturas de anelamento, tamanhos esperados dos produtos em pares de bases (pb), e classificação de cada iniciador desenvolvido para *Trema micrantha*.

Nome	Motivo	Sequência	%GC	Temp (°C)	Produto (pb)	Classificação
Tmi04	(TC)24	F: CCGTCTAATTTCTCCTAAAATG	35	54	122	Dinucleotídeo
		R: AGAGCCACAGAGTTAAAACG		54		
Tmi16	(TG)7	F: CCTTCCACTCAACAACCTACTC	40	57	128	Dinucleotídeo
		R: CACACGCACACACACATACG		60		
Tmi17	(GA)6C(AG)6AC(AG)6CAACT AAGTAA(GA)7	F: GAAGAACCTCAAAACGCTAGAA	40	57	190	Dinucleotídeo interrompido composto
		R: CTCTCATTTTCTCTTTCCCTCA		57		
Tmi26	(CA)8	F: ATGAGGAGAGAAACTGGCGA	35	59	123	Dinucleotídeo
		R: GAGATTCCAACCTTATTGTTGAGC		58		
Tmi36	(AG)17	F: GTAGGATCTGGGGCATCTCAT	50	60	176	Dinucleotídeo
		R: GCTATGGCGCTTACGATAGGT		60		

#### 4.1.3 Análises estatísticas

A Diversidade genética entre as populações coletadas no estado de Amazonas, foi estimada pelo número total de alelos (AT), número médio de alelos (A), heterozigosidade observada (HO) e esperada (HE), o índice de fixação (F), e equilíbrio de Hardy – Weinberg (EHW) calculados usando a função `divBasic` do pacote `diversity` a partir do projeto R (Keenan et al. 2013) na plataforma R (R Core Team, 2017). O EHW foi realizado pelo teste exato de Fisher com 20000 permutações. O nível de significância ( $P \leq 0.05$ ) do EHW foi ajustado com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Para a estrutura genética entre os indivíduos nas populações amostradas, foram calculadas as estatísticas F de Wright (1951), FIT (níveis de endogamia total nos indivíduos de todas as populações), FIS (índice de endogamia dentro das subpopulações devido ao sistema reprodutivo) e FST (diferenciação genética entre populações) através dos algoritmos de Weir e Cockerham (1984). Foi calculado uma matriz FST (Weir e Cockerham, 1984) com os valores par a par entre as populações. Para verificar o grau de variação genética de acordo com os níveis hierárquicos entre e dentro dos grupos de indivíduos amostrados nas populações, foi realizada loco por loco a análise de variância molecular (AMOVA) (locus-by-locus AMOVA). As estatísticas F de Wright (1951) e a matriz FST foram calculadas e avaliadas com significância ( $P \leq 0.05$ ) através de 20000 bootstrapping, utilizando a função

diffCalc do pacote diveRsity (Keenan et al. 2013). A AMOVA foi realizada utilizando a função poppr.amova do pacote poppr (Kamvar et al. 2014) com 20000 permutações no testes de significância. Estas foram realizadas na plataforma R (R Core Team, 2019).

Foi realizada uma análise Bayesiana para determinar o número de clusters dentro do conjunto de acessos avaliados, utilizando o software Structure (Pritchard; Stephens; Donnelly, 2000) através do modelo Admixture. Este modelo é aplicado normalmente em populações reais ou naturais. O número de clusters (K) foi definido de 1 a 5, e para cada K foram realizadas 10 iterações, com um Burn-in de 100000 seguido por 500000 iterações Markov Chain Monte Carlo (MCMC). O número de clusters foi estimado após a comparação dos métodos de Evanno  $\Delta K$ , indicando que o K mais provável é onde a mudança é maior na taxa de mudança de segunda ordem em  $\Pr(X | K)$  entre valores sucessivos de K (Evanno, Regnaut, & Goudet, 2005) e pela estimativa do  $\ln \Pr(X/K)$  para diferentes valores de (Pritchard et al. 2000). Com o valor de K selecionado foi realizado um consenso das iterações realizadas neste cluster, através do programa CLUMPP v.1.1.2 - Cluster Matching and Permutation Program (Jakobsson e Rosenberg, 2007) e com o programa Distruct v. 1.1 (Rosenberg, 2004) foi realizada a visualização gráfica da estrutura da população.

#### **4.2 Desenvolvimento de modelagem ecológica para populações naturais ou distribuição de *Trema micrantha***

Informações de ocorrência de *Trema micrantha* foram obtidas a partir de bancos de dados que apresentavam presença da espécie. Os bancos de dados contêm pontos georreferenciados de ocorrência (latitude e longitude), armazenados no site do Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA (Cria, 1999).

Este banco de dados de coleções biológicas é de livre acesso, e pode ser acessado por meio da ferramenta SpeciesLink, sistema de informações sobre espécies onde são armazenadas informações reunidas a partir de herbários de todo o país, associado a um sistema de previsão de distribuição geográfica de espécies, baseado em modelagem matemática.

Primeiramente foi verificada a consistência dos dados dos locais de presença de *T. micrantha*. Foram eliminados pontos discrepantes (outliers), isolados dos agrupamentos principais e que não corroboram com as informações de distribuição natural da espécie. Em uma segunda análise, foram corrigidas coordenadas invertidas (latitude com longitude e vice-versa) e excluídas as incorretas (ocorrência sobre o mar, por exemplo). A modelagem da predição de ocorrência foi feita apenas para o Brasil, sendo retiradas as coordenadas com



registro de presença da espécie em outros países. Para este fim, foi utilizado sistema de informações geográficas - SIG.

Os dados climáticos do período atual e dos cenários futuros foram obtidos no site do Worldclim e foram gerados mapas das variáveis bioclimáticas com resolução espacial aproximada de 1 km<sup>2</sup>, o que corresponde a 30" na linha do equador. As variáveis bioclimáticas foram organizadas na escala temporal mensal, estacional e anual, sendo trabalhadas as principais variáveis de importância para determinação da distribuição das espécies, como por exemplo a temperatura do ar e a precipitação pluvial, entre outras (Kumar; Stohlgren, 2009). Os dados do período base ("período presente") foram os registradas entre 2009 e 2019. Os cenários futuros foram projetados para 2050 e 2070.

Os mapas de clima atual e de cenários climáticos futuros foram elaborados usando-se regressão linear múltipla, utilizando a latitude, a longitude e o modelo numérico do terreno (representando a altitude), como variáveis preditoras. Para a modelagem da predição de ocorrência, foram selecionadas 19 variáveis bioclimáticas (Tabela 3), incluindo temperaturas mínimas e máximas e precipitação pluvial.

**Tabela 3.** Variáveis bioclimáticas selecionadas para uso na modelagem da predição de ocorrência da espécie em estudo, com o código e sua correspondência, variável.

Código	Variável
Bio1	Temperatura média anual (°C)
Bio2	Média mensal da variação diária da temperatura (temp. máxima - temp. mínima)(°C)
Bio3	Isotermalidade (Bio2/Bio7) (* 100)
Bio4	Sazonalidade da temperatura (desvio padrão *100)
Bio5	Temperatura máxima no mês mais quente (°C)
Bio6	Temperatura mínima no mês mais frio (°C)
Bio7	Variação anual da temperatura (Bio5-Bio6) (°C)
Bio8	Temperatura média no trimestre mais úmido (°C)
Bio9	Temperatura média no trimestre mais seco (°C)
Bio10	Temperatura média no trimestre mais quente (°C)
Bio11	Temperatura média no trimestre mais frio (°C)
Bio12	Precipitação pluvial acumulada no ano (mm)
Bio13	Precipitação pluvial acumulada no mês mais úmido (mm)
Bio14	Precipitação pluvial acumulada no mês mais seco (mm)
Bio15	Sazonalidade da precipitação pluvial (coeficiente de variação)
Bio16	Precipitação pluvial acumulada no trimestre mais úmido (mm)
Bio17	Precipitação pluvial acumulada no trimestre mais seco (mm)
Bio18	Precipitação pluvial acumulada no trimestre mais quente (mm)
Bio19	Precipitação pluvial acumulada no trimestre mais frio (mm)

Os dados climáticos a serem usados no trabalho, da base do Worldclim, foram

organizados, compilados e consistidos. Foram calculadas as médias do período base, compreendido entre 2009 e 2019, das variáveis climáticas listadas na Tabela 3. Sobre essa base, seguindo-se as tendências do quarto relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (AR4/IPCC) (IPCC, 2007), foram calculados os cenários climáticos futuros, sendo um cenário mais pessimista, com manutenção dos padrões atuais de emissões de GEEs, e outro cenário de menores emissões ou cenário menos pessimista (Nakicenovic et al., 2000).

A predição de distribuição geográfica foi feita para quatro modelos de algoritmo: Climate space model, Envelope Score, Niche Mosaic e Environmental Distance. A modelagem da predição futura de ocorrência da espécie foi feita com o uso do software Open Modeller. Este programa trabalha com dados de distribuição geográfica de espécies (latitude e longitude) e com mapas ou camadas ambientais (clima, solos e relevo), compondo um sistema matemático de previsão de distribuição de espécies.

As variáveis ambientais foram as mesmas para o presente e para o futuro. Os mapas de saídas dos modelos foram transformados em valores numéricos, variando entre 0 e 1. Cada pixel do mapa passou a representar um valor, 0 ou 1, sendo 0 relacionado a não possibilidade de ocorrência da espécie e 1 a possibilidade máxima de ocorrência. Os mapas formados no Open Modeller em formato de texto ASCII (American Standard Code for Information Interchange), contendo estes valores binários, foram importados para o ArcGIS e transformados para o formato 'raster'. Foram posteriormente criadas classes de categoria, com um gradiente variando de '0' a '1', representando desde as zonas sem possibilidade de ocorrência até as zonas com possibilidade máxima de ocorrência, respectivamente, para o desenvolvimento da espécie.

A avaliação da qualidade dos modelos ajustados foi feita a partir de cálculo da área sob a curva (Area Under the Curve - AUC), obtida a partir da integração da curva de Características Operacionais do Receptor (Receiver Operating Characteristic - ROC). O valor máximo de AUC é, teoricamente, 1,0 e indica discriminação perfeita, enquanto que valores inferiores a 0,5 denotam baixo desempenho da modelagem. O teste de Jackknife foi aplicado para diagnosticar a contribuição relativa de cada variável bioclimática.

Com isto, neste estudo foram identificados locais onde devem ser priorizados programas de conservação de populações naturais da espécie considerando o clima do período atual e o das próximas décadas, projetado de acordo com as análises das mudanças climáticas globais.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diversidade e estrutura genética em populações de *Trema micrantha* no Amazonas

#### 5.1.1 Índices de diversidade genética

Os cinco locos polimórficos confirmaram informação genética com um total de 65 alelos, variando de 9 a 22 alelos por loco, com média de 17,58 alelos por loco (Tabela 4). Os locos 02 e 04 mostraram ser menos polimórficos, e o 03 foi o que apresentou maior polimorfismo. A heterozigosidade esperada (HE) variou entre 0,42 para o loco 04 e 0,85 para o loco 03, com uma média total dos locos de 0,67. As heterozigosidades observadas (HO) apresentaram valores inferiores às HE para todos os locos. As HO variaram entre 0,354 para o loco 02 e 0,642 para o loco 03. A média de todos os locos para HO foi de 0,472 e é inferior à média de HE. O coeficiente de endogamia ou índice de fixação ( $f$ ) nos locos apresentou valores superiores à zero, o que mostra possíveis cruzamentos endogâmicos para as populações avaliadas (Tabela 4).

O uso de microssatélites nas diferentes populações de *T. micrantha* revelaram altos índices de diversidade genética, onde podemos destacar o alto conteúdo de informação genética observada pelo número médio de alelos por loco. Este resultado foi superior ao encontrado em outros estudos utilizando marcadores microssatélites. Foram utilizados cinco iniciadores de microssatélites para identificar a variabilidade genética entre acessos da espécie *Trema micrantha*, e foi encontrada uma média de seis alelos por loco. Assim, os resultados do número de alelos por loco do presente estudo são uma indicação de elevada diversidade genética para a espécie.

**Tabela 4.** Índices de diversidade genética ao nível dos locos (iniciadores) de microssatélites obtidos a partir das populações de *Trema micrantha* coletadas no estado de Amazonas

Loco	$n$	$A_T$	$A_m$	$H_O$	$H_E$	$f$
01	9.2	13	8.2	0.562	0.84	0.33
02	7.8	9	4.6	0.354	0.50	0.26
03	9.4	22	10.2	0.642	0.85	0.25
04	8.0	9	4.0	0.392	0.42	0.03
05	8.0	12	7.2	0.406	0.76	0.46
Média	8.5	13	6.8	0.472	0.67	0.30

$n$  = número de indivíduos analisados por locos;  $A_T$  = número de alelos identificados por loco;  $A$  = média do número de alelos identificados no loco em relação a população;  $H_E$  = Heterozigosidade esperada;  $H_O$  = Heterozigosidade observada;  $f$  = coeficiente de endogamia.

Nas cinco populações os cinco locos mostraram um número médio de alelos que variou entre 4,4 para a população de Itacoatiara (Estrada do Aeroporto), e 8, para as

populações de Itacoatiara (Comunidade São João). A HE nas populações variou entre 0,59 para a população de Itacoatiara (Estrada do Aeroporto) e 0,76 para a população de Itacoatiara (Comunidade São João). Os valores das heterozigosidades observadas (HO) variaram de 0,37 (Itacoatiara (Estrada do Aeroporto) e 0,57 (UFAM). A média das HO de todas as populações foi de 0,472, mostrando ser inferior à HE com 0,674. O coeficiente de endogamia ou índice de fixação (f) nos locos apresentou valores superiores à zero, mostrando um excesso de homozigotos (Tabela 5).

Testes de cruzamento realizados por Torres (1996) indicaram que *Trema micrantha* é uma espécie alógama facultativa, podendo se reproduzir através de fecundação cruzada nas plantas femininas constantes, ou de autofecundação, nas plantas hermafroditas crípticas durante sua fase monoica, o que pode estar associado ao elevado número de homozigotos e o valor de heterozigosidade observada inferior ao esperado.

**Tabela 5.** Índices de diversidade genética ao nível das 5 populações, obtidas a partir de 5 locos de microssatélites desenvolvidos para *Trema micrantha*.

Municípios – Populações	<i>n</i>	<i>A<sub>T</sub></i>	<i>A</i>	<i>H<sub>O</sub></i>	<i>H<sub>E</sub></i>	<i>f</i>
Itacoatiara - Estrada do Aeroporto	4.2	22	4.4	0.37	0.59	0.38
Parintins - Estrada do Aeroporto	7.8	29	5.8	0.41	0.63	0.34
UFAM - Campus setor Sul	8.4	40	8.0	0.57	0.71	0.20
Parintins - Comunidade Nossa Sra	9.4	38	7.6	0.46	0.68	0.32
Itacoatiara - Comunidade São João	12.6	42	8.4	0.55	0.76	0.27
Média	8.48	34.2	6.84	0.472	0.674	0.30

*n* = Média do número de indivíduos analisados por locos; *A<sub>T</sub>* = número de alelos identificados na população; *A* = média do número de alelos identificados na população; *H<sub>E</sub>* = Heterozigosidade esperada; *H<sub>O</sub>* = Heterozigosidade observada; *f* = coeficiente de endogamia.

### 5.1.2 Estrutura genética

Os resultados das análises das estimativas das estatísticas F de Wright (1951) para os cinco locos nas cinco populações de *T. micrantha* amostradas, a endogamia total (FIT) foi de 0,3536, a endogamia dentro da população devido ao sistema reprodutivo ou intrapopulacional (FIS) foi de 0,3452, valor que é maior em relação à endogamia devida à subdivisão (FST) com 0,0128 (Tabela 6). Os índices de fixação FIS e FIT apresentaram estimativas significativamente maiores que zero, considerando os intervalos de confiança de 95% do bootstrapping. Entretanto, o FST apresentou uma estruturação muito baixa de 1,3%, porém não foi significativo por incluir o zero nos os intervalos de confiança. Estes resultados sugerem que a diversidade está mais concentrada entre as populações do que dentro das populações.

**Tabela 6.** Resultados das estimativas das estatísticas F de Wright (1951) obtidas para 5 populações de *Trema micrantha* utilizando 5 locos de microssatélites específicos.

	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
Sob todos os locos	0.3452	0.0128	0.3536
Superior (CI <sub>95%</sub> )	0.4187	0.0653	0.4215
Inferior (CI <sub>95%</sub> )	0.2627	-0.0282	0.285

CI<sub>95%</sub> = 95% intervalo de confiança através de 20000 *bootstrapping*.

O FST indica que não existe estrutura genética entre populações amostradas, ou seja, existe uma única população. Também confirma que do total da variabilidade genética observada para as populações amostradas (FIT) a maior parte encontra-se dentro das populações (FIS) amostradas (Hartl e Clark, 2010).

A diferenciação genética obtida pelo FST par a par entre as populações mostrou que a metade das comparações difere significativamente entre si, informação observada ao comparar o nível de significância ( $P \leq 0,005$ , após ajustar a correção de Bonferroni (Rice, 1989) com as probabilidades de cada comparação par a par (Tabela 7). A maior diferença foi observada entre as populações amostradas de Itacoatiara (Estrada do Aeroporto) e Parintins (Estrada do Aeroporto) ( $p=0.0494$ ). Nas populações amostradas e comparadas a população de Parintins (Estrada do Aeroporto) foi a que diferiu significativamente com as outras populações. A comparação FST par a par que apresentou menor diferença foi entre as populações da UFAM e de Parintins (Comunidade Nossa Senhora de Fátima) ( $p= -0.0047$ ).

**Tabela 7.** Comparações do FST par a par entre as cinco populações de *Trema micrantha* coletadas no estado de Amazonas.

Municípios – Populações	1	2	3	4	5
Itacoatiara - Estrada do Aeroporto	0.0000				
Parintins - Estrada do Aeroporto	0.0171	0.0000			
UFAM - Campus setor Sul	0.0032	0.0099	0.0000		
Parintins - Comunidade Nossa Sra	-0.0020	0.0494	-0.0003	0.0000	
Itacoatiara - Comunidade São João	-0.0069	0.0297	-0.0047	0.0238	0.0000

\* = Comparações  $F_{ST}$  par a par significativas, indicando diferença entre populações ( $P = 0,005$ ).

Os graus de diferenciação entre populações pela análise FST par a par, mostraram

que não existe significância entre as populações, o que confirma o comportamento esperado, de que as populações não apresentam estrutura genética (Wright, 1951). Este resultado pode estar fortemente influenciado pelas características da espécie, assim como pela capacidade de dispersão de seu material genético, do grau de isolamento da população, do sistema de autoincompatibilidade e diversidade alélica que esta apresenta (Leducq et al., 2011). Ou estas podem estar agrupadas de acordo com a quantidade de fluxo gênico pela distribuição de migrantes através de seus dispersores, como aves (Sebben e Degen, 2015). Esta dispersão de sementes é importante para determinar a colonização de novos sítios e migração entre populações vizinhas, principalmente se é zoocórica, porque a faixa de dispersão de sementes pode ser substancialmente maior (Barluenga et al., 2011).

Os resultados da AMOVA mostram que entre as populações apresenta uma variação genética muito baixa (1,54%), o que significaria uma falta de estruturação. Existe uma variação genética nos indivíduos de cada população (32,751%). Considerando todos os indivíduos amostrados elas apresentam uma alta diferenciação genética (65,709%) (Tabela 8). Também pode verificar pela AMOVA que a maior concentração da diversidade ocorre dentro de populações.

**Tabela 8.** Análise da variância molecular (AMOVA) realizado para cinco populações de *Trema micrantha* coletada no estado do Amazonas.

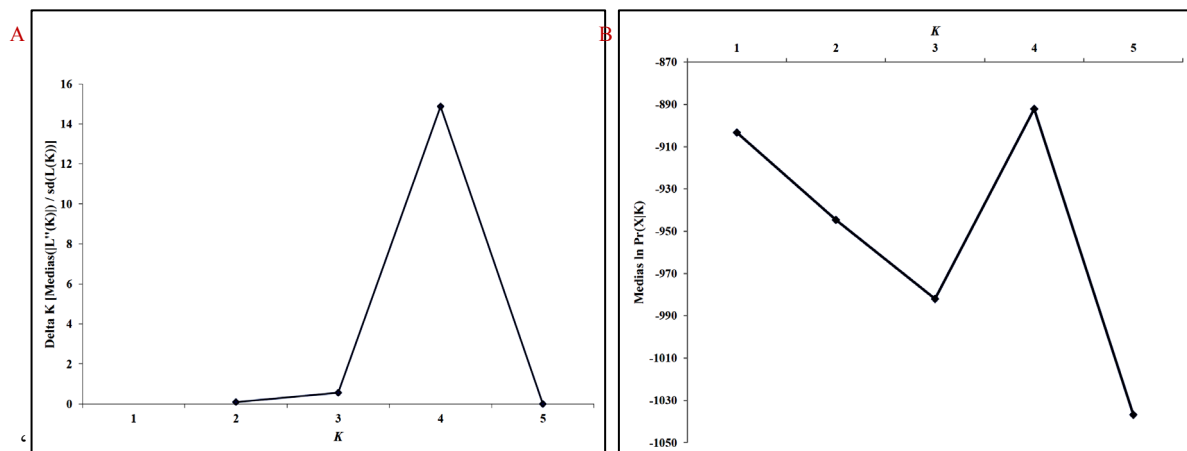
AMOVA - Sem níveis individuais (populações)				
Fonte de variação	Grau de Liberdade	Quadrado médio	Componente de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	4	6.298	0.061	1.540
Entre indivíduos dentro de populações	42	5.183	1.294	32.751
Dentro de Indivíduos	47	2.595	2.595	65.709
Total	93	3.923	3.950	100.000

P-valor =0.0 (Estimado com base em 20000 permutações).

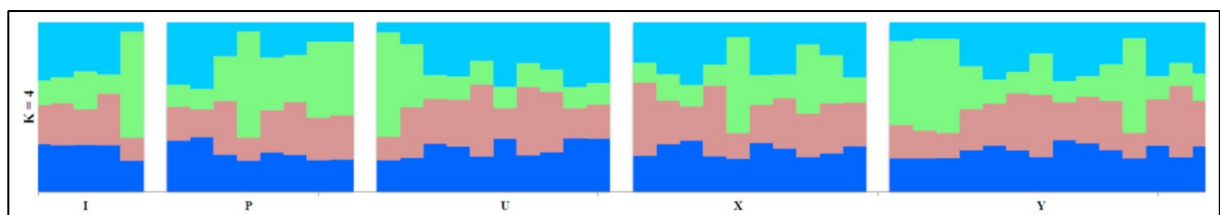
Quando estimado o número de populações geneticamente homogêneas (K) entre todos os indivíduos amostrados através da análise Bayesiana realizada pelo software Structure, das 05 populações, observou-se a ocorrência de quatro agrupamentos, K= 4, de acordo aos métodos de Evanno  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005) e Pritchard et al. (2000) (Figura 7). Ao visualizar o agrupamento de K=4 no gráfico não mostra consistência ao formar a estruturação populacional (Figura 7; Tabela 8). Portanto, observamos também que pelo método de Pritchard et al. (2000) existe a possibilidade de um único grupo (Figura 8).

Estes agrupamentos obtidos na análise Bayesiana, K=4. Sustentam as semelhanças e

diferenças entre as populações de *T. micrantha*, revelando e confirmando a conectividade das populações amostradas.



**Figura 6.** Valores de  $\Delta K$  para cada valor de K obtidas pela análise Bayesiana, considerando todas as populações amostradas. O maior valor  $\Delta K$  representa o valor ideal de K de acordo com o proposto por: A) Evanno et al. (2005). B) Pritchard et al. (2000)

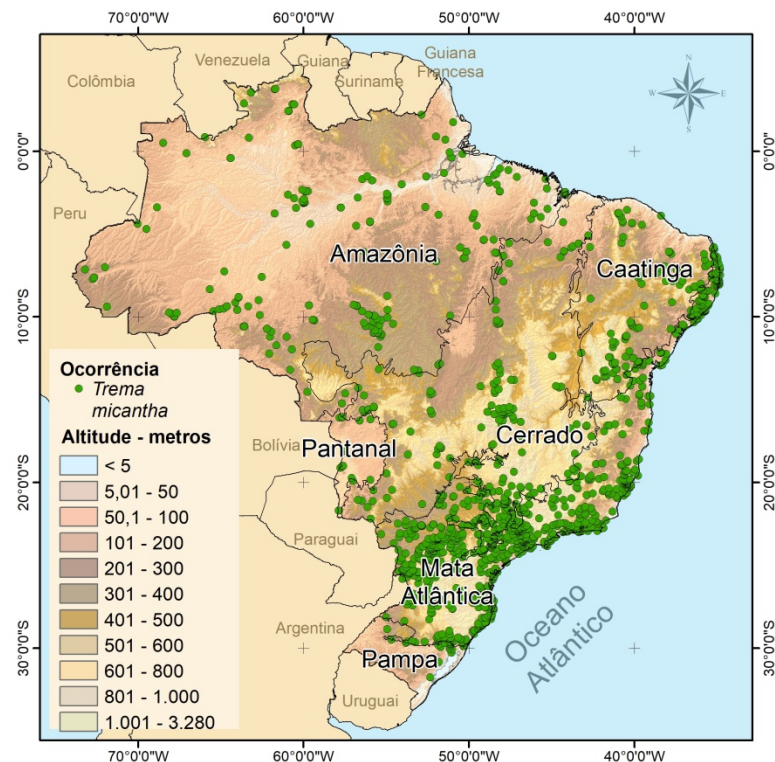


**Figura 7.** Análise da estrutura genética das 47 plantas, amostradas em cinco populações de *Trema micrantha*, a partir de cinco locos microssatélites, realizadas no programa Structure (Pritchard et al., 2000). As populações não apresentaram estruturação.

Com relação ao manejo da espécie, os resultados genéticos indicam que a conservação da espécie deve ser realizada em qualquer uma destas populações, como indicam todos os resultados obtidos nas diferentes análises. Seria importante ampliar as áreas de amostragem e verificar se existe ainda esta conexão geográfica entre as populações.

## 5.2 Modelagem ecológica para populações naturais ou distribuição de *Trema micrantha*

A partir dos bancos de dados da coleção biológica do CRIA, foi possível obter 3.494 pontos de ocorrência de *T. micrantha* no Brasil, (Figura 9), após a eliminação dos pontos discrepantes, com erro de localização ou situados fora do Brasil.

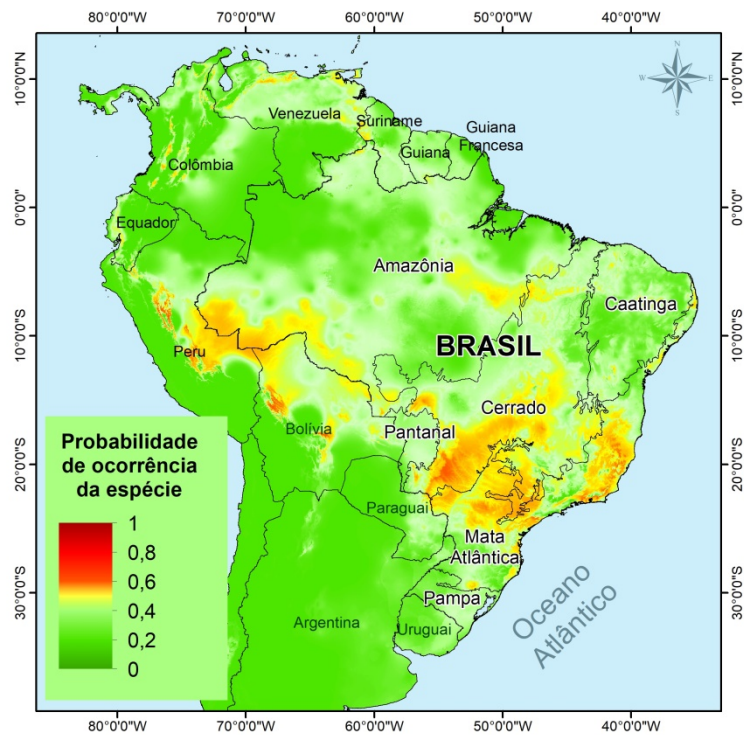


**Figura 8.** Dados de ocorrência de *Trema micrantha* por biomas no Brasil (Modelo Envelope Score).

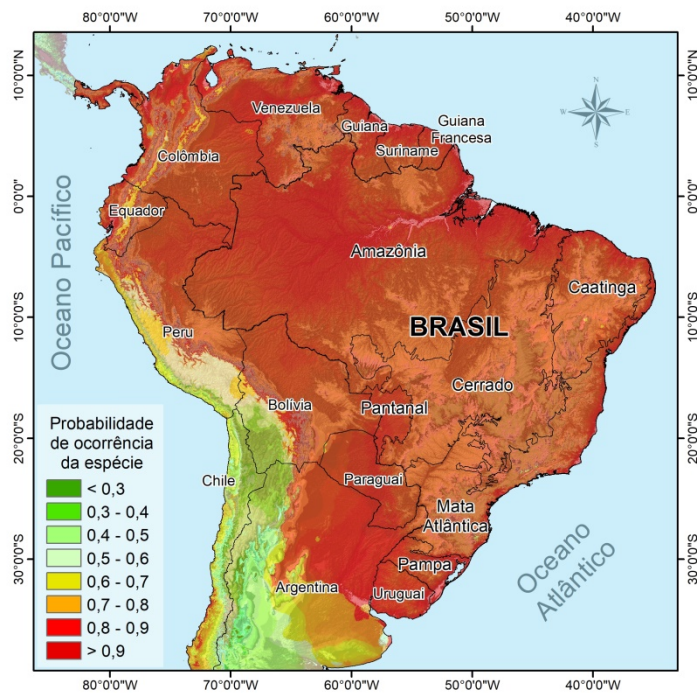
O mapeamento da distribuição atual de *T. micrantha*, com base nos pontos de presença da espécie, foi significativo para todos os modelos utilizados ( $p < 0,001$ ), Modelo Environmental Distance (Figura 10) e Modelo Envelope Score (Figura 11). Entre os modelos gerados, foi selecionado o mais representativo da distribuição. O que apresentou maior similaridade com a distribuição da espécie foi o Envelope Score. O modelo utilizado permitiu expressar a ocorrência potencial da espécie em área que abrange o domínio de todos os seis biomas (Figura 11).

Segundo Ferreira et al.(1977), as sementes da *Trema micrantha* conservam seu poder germinativo por muito tempo, não sendo inviabilizadas pela ação do fogo. Após queimadas, surgem inúmeras plântulas que rapidamente se fixam e desenvolvem, o que pode explicar a ampla distribuição da espécie em biomas que já foram severamente alterados.





**Figura 9.** Distribuição de *Trema micrantha* no Brasil por biomas no período atual (Modelo Environmental Distance).



**Figura 10.** Distribuição de *Trema micrantha* no Brasil por biomas no período atual (Modelo Envelope Score).

As projeções realizadas para os cenários climáticos menos pessimistas (RCP 45) e mais pessimistas (RCP 85) no futuro (Figuras 12, 13, 14 e 15) apontam para redução das áreas aptas ao desenvolvimento da espécie nos dois períodos avaliados (2020-2050 e 2051-2070), sendo que as áreas mais sensíveis à redução da espécie estão concentradas nos biomas Amazônia, Pantanal e Cerrado.

Os resultados gerados demonstram que *Trema micrantha* possui distribuição ampla pelo Atlântico, apresentando predominância nas partes litorâneas dos biomas Caatinga e Mata Atlântica, condizendo com estudos que a classificam como uma espécie neotropical, comum em fases iniciais da sucessão secundária, se adaptando em vários tipos de formações vegetais (Lorenzi, 2008), sendo marcante em florestas ombrófilas densas, mas também em campos rupestres (Carvalho, 1994). Com isso, a projeção atual gerada pela modelagem utilizada corrobora com o descrito pelo levantamento de literatura.

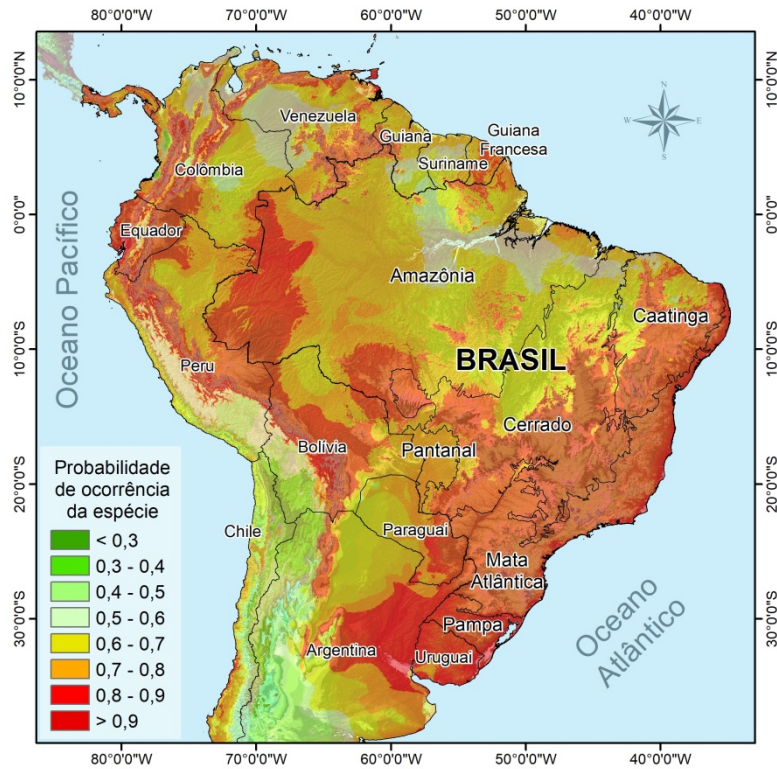
Algumas variáveis climáticas, como baixa umidade na estação mais seca no Cerrado e Caatinga, que eventualmente ocasionam incêndios florestais, demonstraram ser importantes elementos ecológicos na determinação da área de ocorrência de *T. micrantha*, já que sua frequência é maior em áreas alteradas. De forma geral, os resultados sugerem que a espécie tem um caráter tropical, sendo tolerante tanto à secas quanto aos mais altos índices de umidade, o que pode explicar sua ampla área de ocorrência desde o nordeste até o litoral do sudeste e sul do Brasil.

Além destes fatores ecológicos, não se pode ignorar a capacidade da influência humana sobre o padrão de distribuição geográfica das espécies arbóreas. Neste contexto, como a Mata Atlântica representa a formação florestal que mais tem sido influenciada por práticas antrópicas, sendo a *T. micrantha* colonizadora especialmente de ambientes alterados, isso explica sua alta incidência neste bioma.

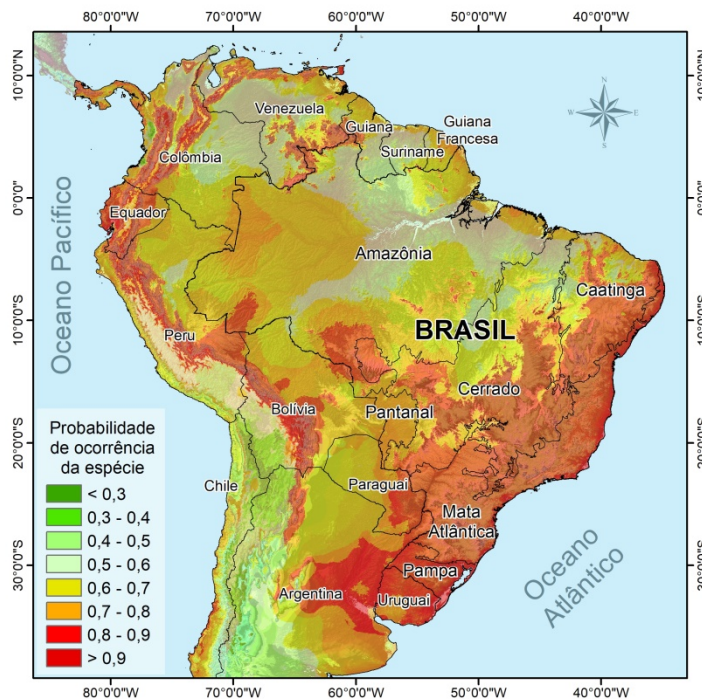
No caso do bioma Caatinga, além de ser das primeiras a se estabelecer em áreas abandonadas por agricultores (Lorenzi, 2008), também atua como pioneira na estabilização de dunas (Kageyama, 1992), o que pode estar relacionado com a sua distribuição mais ampla no litoral do nordeste brasileiro.

Nos diferentes cenários de mudanças climáticas estipulados, os resultados mostraram impactos sobre a distribuição geográfica potencial de *T. micrantha* com uma tendência de alterações muito maiores para a Amazônia. Isto pode ser explicado pelo fato deste bioma ser o mais sensível às mudanças climáticas. Porém, estas circunstâncias ainda devem ser associadas a outros fatores de natureza antrópica, como o fato da Amazônia ser o bioma mais intensamente explorado, onde mais se concentram atividades predatórias ilegais, seja por falta de fiscalização

devido condições adversas da região ou mesmo falta de recursos, o que aumenta a incerteza quanto às predições futuras de ocorrência geográfica de espécies.

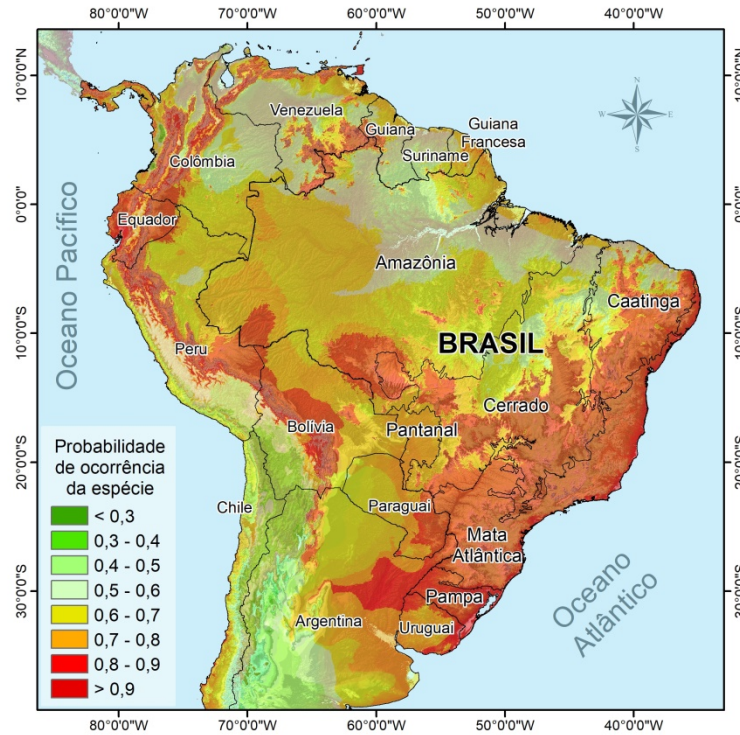


**Figura 11.** Projeção para o período de 2020-2050, no cenário RCP 45, da distribuição de *Trema micrantha* no Brasil por biomas de acordo com as mudanças climáticas globais (Modelo Envelope Score).

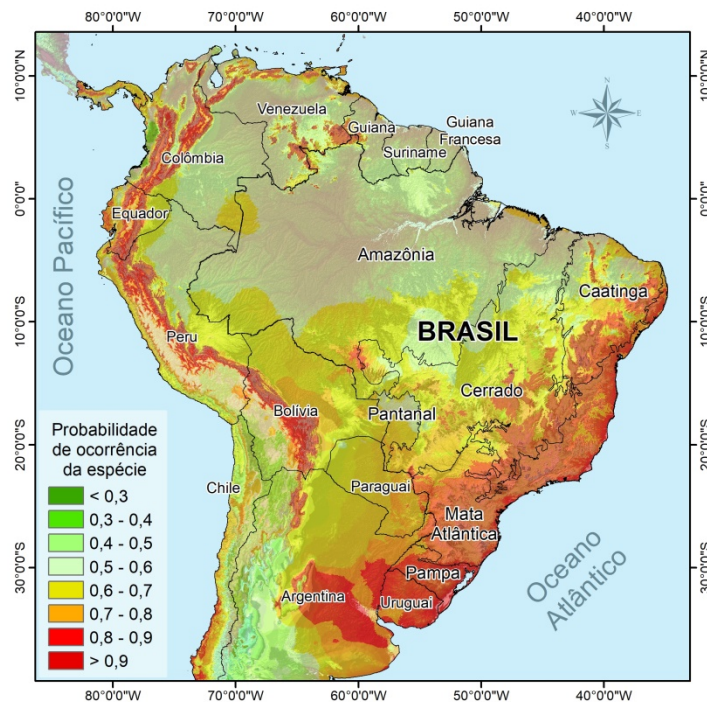




**Figura 12.** Projeção para 2051-2070, no cenário RCP 45, da distribuição de *Trema micrantha* no Brasil por biomas de acordo com as mudanças climáticas globais (Modelo Envelope Score).



**Figura 13.** Projeção para o período de 2020-2050, no cenário RCP 85, da distribuição de *Trema micrantha* no Brasil por biomas de acordo com as mudanças climáticas globais (Modelo Envelope Score).



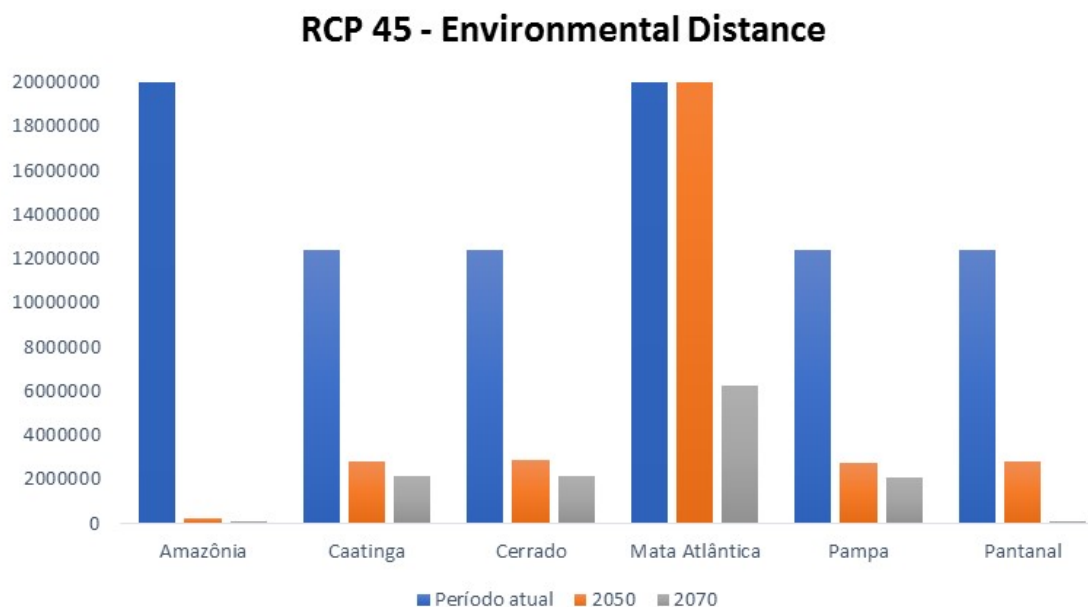
**Figura 14.** Projeção para o período de 2051-2070, no cenário RCP 85, da distribuição de *Trema micrantha* no Brasil por biomas de acordo com as mudanças climáticas globais (Modelo Envelope Score).

Entre os modelos gerados durante a tabulação de dados, para o cálculo da área foi selecionado aquele que apresentou a maior similaridade com os pontos de ocorrência da espécie. No caso, foi escolhido o modelo *Environmental distance*, o qual, permitiu identificar a potencial ocorrência da espécie em áreas aptas de cinco biomas brasileiros, dentre eles, Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pampa. As projeções obtidas para os cenários futuros mostram a redução de áreas aptas ao desenvolvimento da espécie nos dois períodos levados em consideração para a análise (2020-2050 e 2051-2070), de modo que os biomas mais sensíveis são o da Amazônia devido a sensibilidade à variações climáticas (SEDDON et al., 2016) e o Pantanal que de acordo com dados na literatura, é uma região que tem sofrido com desmatamento em demasia (FAUSTO et al., 2016) devido a indústria agropecuária (AZEVEDO; SAITO, 2013).

Os modelos apresentados, indicam a sensibilidade de *Trema micrantha* nos biomas da Amazônia e Pantanal no cenário menos pessimista (RCP 45), de modo que a mudança para cada período foi de redução de área apta para a espécie no período de 2050 e 2070, com exceção da Mata Atlântica que se mantém em 2050. Enquanto no cenário mais pessimista (RCP 85), a espécie se torna sensível a todos os biomas, inclusive no Bioma do Pantanal, a presença da espécie se torna extinta. Há exceção para a Mata Atlântica em que ainda há resquícios da planta.

Dessa forma, as populações naturais de *T. micrantha* nos biomas Amazônia e Pantanal, devem ser priorizadas para coletas, implantação de novos plantios, desenvolvimento de coleções de germoplasma para sua conservação e conseqüente melhoramento genético. Assim como uma pesquisa mais detalhada nas áreas de ocorrência da espécie poderá contribuir de modo mais eficiente, principalmente se em conjunto com informações acerca da variabilidade genética de populações de *T. micrantha* e o potencial de adaptação das mesmas em cada ambiente ou bioma.

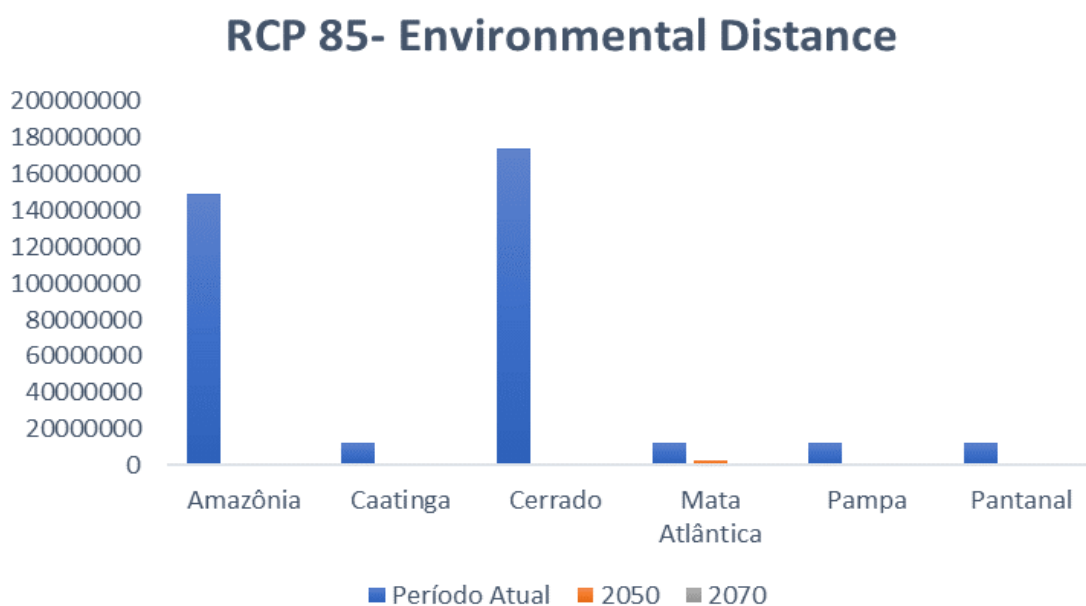
**Figura 15.** Área de distribuição (em km<sup>2</sup>) por bioma de *T. micrantha* no cenário RCP 45 nos dois períodos (Modelo Environmental Distance).



**Tabela 9.** Área, em quilômetros quadrados, na projeção do cenário RCP 45 para ambos períodos. Fonte: Próprio autor.

	Área (km <sup>2</sup> )		
	2009 - 2019	2020 - 2050	2051 - 2070
<b>Amazônia</b>	148957437,8	209900,4707	16872,2246
<b>Caatinga</b>	12411800	2781347,5253	2140495,6434
<b>Cerrado</b>	12411821,7	2844203,2775	2148039,8666
<b>Mata Atlântica</b>	173766311,6	30522219,8543	6241983,9515
<b>Pampa</b>	12411891,11	2774567,6401	2086734,4832
<b>Pantanal</b>	12411800	2811143,4396	82,2344

**Figura 16.** Área de distribuição (em km<sup>2</sup>) por bioma de *T. micrantha* no cenário RCP 85 nos dois períodos (Modelo Environmental Distance).



**Tabela 10.** Área, em quilômetros quadrados, na projeção do cenário RCP 85 para ambos períodos. Fonte: Próprio autor

Biomias	Área (km <sup>2</sup> )		
	2009-2019	2020-2050	2051-2070
Amazônia	148957437,8	103205,9924	3523,4607
Mata Atlântica	12411800	2804553,547	1479703,85
Caatinga	12411821,7	915207,3297	813933,614
Cerrado	173766311,6	1495079,737	789396,005
Pampa	12411891,11	474026,9174	106661,8098

## 6. CONCLUSÕES

Existe alta diversidade genética entre os indivíduos amostrados dentro de populações naturais de *Trema micrantha* e sua estrutura genética se apresenta como uma metapopulação. Ressalta-se que novos indivíduos e outros locos microssatélites devem ser analisados para aumentar a amostragem e confirmar dos resultados.

*Trema micrantha* apresenta distribuição geográfica no território brasileiro associada, principalmente, a áreas alteradas em processo de sucessão secundária, e com um caráter tropical.

As áreas mais sensíveis à redução da espécie no Brasil a partir de projeções para os períodos de 2020-2050 e 2051-2070 estão concentradas nos biomas Amazônia, Pantanal e Cerrado.

As áreas litorâneas dos biomas Caatinga e Mata Atlântica podem ser consideradas como estratégicas para a conservação e manejo sustentável da espécie, uma vez que apresentaram maior adequabilidade climática para *Trema micrantha* e podem funcionar como áreas prioritárias para coleta de sementes para reflorestamentos e para conservação da variabilidade genética da espécie *in situ*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, P. F. **Variação genética para caracteres silviculturais e marcador molecular em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.** Dissertação. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. 2009. 59f.
- Andreani, D.V. de M.; Macedo, M.; Evangelista, M. M.; Almeida, S.M. **Aves como potenciais dispersoras de *Trema micrantha* (L.) Blume (Cannabaceae) em um fragmento florestal no estado de Mato Grosso.** *Atualidades Ornitológicas*, 2014, 33-37.
- Backes, P.; Irgang, B.. **Mata Atlântica: as árvores e a paisagem.** Porto Alegre: Paisagens do Sul, 2004. 293 p.
- Barbera, R. et al. **Analgesic and anti-inflammatory activity in acute and chronic conditions of *Trema guineensis* (Schum. et Thonn.) Ficalho and *Trema micrantha* Blume extracts in rodents.** *Phytotherapy Research*, 1992. 6: 146-148.
- Barluenga, M.; Austerlitz, F.; Elzinga, J.A.; Teixeira, S.; Goudet, J.; Bernasconi, G. **Fine-scale spatial genetic structure and gene dispersal in *Silene latifolia*.** *Heredity*, London, v. 106, p.13–24, Jan. 2011.
- Barroso, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1978. 255p.
- Bawa, K. S. et al. **Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems.** *American Journal of Botany*, New York, v.72, n. 3, p. 346- 356, 1985.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.L.; Risterucci, A.M.; Baurens, F.C. **Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops.** *Fruits*, Paris, v. 54, p. 277–288, Aug. 1999.
- Borém, A.; Miranda, G. V. 2009. **Melhoramento de Plantas.** Viçosa: UFV, 6. ed. 529.
- Boshier, D.H.; Lamb, A.T **Mating System, Population Structure and Gene Flow.** *Tropical*

Forestry Papers 36. P. 29 – 38.

Brokaw, N. V. L. **Gap-phase regeneration of three pioneer tree species in a tropical forest.** *Journal of Ecology*, 1987. 75:9–19.

Brondani, R.P.V; Brondani, C; Grattapaglia D. **Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas.** Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF. 2007. 111p.

Caixeta, E.T.; Oliveira, A.C.B.; Brito, G.G.; Sakiyama, N. **Tipos de marcadores moleculares.** *Marcadores Moleculares*. 2nd ed. Viçosa, MG, 2009. 54-66.

Carvalho, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: EMBRAPA-CNPQ/SPI, 1994. 640p.

Cockerham, C.C. **Variance of gene frequency.** *Evolution*, Oxford, v.23, n.6, p. 72-84, Mar. 1969.

Coops, N.C., Waring, R.H., 2011. **A process-based approach to estimate lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl.) distribution in the Pacific Northwest under climate change.** *Climatic Change* 105, 313–328.

Corner, E. J. H. **The seeds of dicotyledons.** Cambridge: University Press, 1976. 311p.

Davey, J.W.; Hohenlohe, P.A.; Etter, P.D.; Boone, J.Q.; Catchen, J.M.; Blaxter, M.L. **Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing.** *Nature Reviews: Genetics*, London, v. 12, p. 499-510, July 2011.

Denslow, J.S. **Tropical rainforest gaps and trees species diversity.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 18, p. 431–451, 1987.

Dieringer, D.; Schlotterer, C. **Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets.** *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v. 3, n. 1, p. 167-169, Mar. 2003.

Diva-Gis. 2012. **User Manual, version 7.5**. Disponível em: [http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS\\_manual\\_7.pdf](http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS_manual_7.pdf).

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus, Rockville, v. 12, p. 13–15, Jan. 1990.

Durigan, G.; Figliolia, M.B.; Kawabata, M.; Garrido, M, A, O; Baittelo, J.B. **Sementes e mudas de árvores tropicais**. 2. Ed. São Paulo: Instituto Florestal, CNPQ, SMA, LICA, 2002. 65p.

Ellstrand, N.C.; Elam, D.R. **Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation**. Annual review of ecology and systematics, v. 24, p. 217–242, 1993.

Eppersom, B.K. **Geographical genetics**. New Jersey: Princeton University Press, 2003. 356p. (Monographs in Population Biology, 38).

Esfahani, S.T.; Shiran, B.; Balali, G. **AFLP markers for the assessment of genetic diversity in european and North American potato varieties cultivated in Iran**. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 9, n.1, p. 75-86, 2009.

Estopa, R.A.; Souza, A.M.; Moura, C.O.M; Botrel, M.C.G.; Mendonça, E.G.; Carvalho, D. **Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. Scientia Forestalis, n.70, p. 97-106, 2006.

Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows**. Molecular Ecology Resources, Oxford, v.10, p. 564–567, Mar. 2010.

Felsenstein, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.69**. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2004.

Ferreira, M. B.; Gomes, J.; Losada, M. **Subsídios para o estudo de *Trema micrantha* (L.)**

**Blume.** In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26, 1975, Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977. p. 175-187.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.1998.

Furtini Neto, A. E.; Resende, A. V.; Vale, F. R.; Silva, I. R. **Liming effects on growth of Woody species from the Brazilian Cerrado.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43, n.5, p.829-837, 1999.

Goldstein, D.B.; Schlotterer, C. **Microsatellites: evolution and applications.** Oxford University Press, Oxford. 1999.

Guimarães, C. T.; Magalhães, J. V.; Lanza, M. A.; Schuster, I. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético.** Informe Agropecuário, 8elo Horizonte, v.30, n.253, nov./dez. 2009.

Guisan, A.; Thuiller, W. 2005. **Predicting species distribution: offering more than simple habitat models.** Ecology Letters, 8:993-1009.

Hartl, D.L.; Clarck, A.G. **Princípios de genética de populações.** 4.ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 660p.

Hutchinson, G.E. 1957. **Concluding remarks.** Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 22: 415-457.

Jakobsson, M.; Rosenberg, N.A. **CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure.** Bioinformatics, Oxford, v. 23, p. 1801-1806, May. 2007.

Kageyama, P.Y. **Recomposição da vegetação com espécies arbóreas nativas em reservatórios de usinas hidrelétricas da CESP.** Série Técnica IPEF, Piracicaba, v.8, n.25, p.1-43, 1992.

Kirst, M.; Cordeiro, C.M.; Rezende, G.D.S.P.; Grattapaglia, D. **Power of microssatellite**

**markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations.** Heredity, Lund, v.96, n.2, p.161-166, 2005.

Koskela, J.; Amaral, W.A.N. **Conservation of tropical forest genetic resources: IPGRI's efforts and experiences.** SE-Asian Moving Workshop on Conservation, Management and Utilization of Forest Genetics Resources. Thailand. 2002.

Leducq, J.B.; Llaurens, V.; Castric, V.; Saumitou-Laprade, P.; Hardy, O.J.; Vekemans, X. **Effect of balancing selection on spatial genetic structure within populations: theoretical investigations on the self-incompatibility locus and empirical studies in *Arabidopsis halleri*.** Heredity, London, v. 106, p. 319–329, Feb. 2011.

Lewis, P.O.; Zaykin, D. **Genetic data analysis: computer program for the analyse of allelic data.** Version 1.0, 2001.

Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 384p.

Mantel, N. **The detection of disease clustering and a generalized regression approach.** Cancer Research, Philadelphia, v. 27, p.209–220, Feb. 1967.

Márquez-Cruz, U.; López, C.; Negreros-Castillo, P. **Una espécie multiusos del trópico mexicano *Trema micrantha* (L.) Blume.** Ciencias, México, v. 101, 16-22, 2011.

Matos, F. J. A. et al. **Plantas tóxicas: estudos de fitotoxicologia química de plantas brasileiras:** 1-121. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 2011.

Moreira, H. M. **A importância da Amazônia na definição da posição brasileira no regime internacional de mudanças climáticas.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Relações Internacionais “San Tiago Dantas” (UNESOP, UNICAMP, PUC-SP). São Paulo, 2009. 21 p

Moura, T. M.; Sebben, A. M.; Chavez, L. J.; Coelho, A.S.G.; Oliveira, G.C.X.; Kageyama, P.Y. **Diversidade Genética espacial em populações altamente fragmentadas de *Solanum sp.* no Cerrado de Goiás, a partir de locos microssatélites.** Scientia florestalis, v. 37, n. 82, p. 143-

150. 2009.

NEE, M. Ulmaceae. **Flora de Veracruz**, Veracruz, n. 40, p. 28–33. 1993.

Nei, M. **Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals**. *Genetics*, Bethesda, v. 89, p. 583-590, July 1978.

Nóbrega, R. S. A. et al. **Substratos para o crescimento de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume**. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife, v. 5, n. 3, p. 392-397, 2010.

Oliveira-Filho, A.T.; Vilela, E.A.; Carvalho, D.A.; Gavilanes, M.L. **Estudos florísticos e fitossociológicos em remanescentes de matas ciliares do Alto e Médio Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. 27 p.

Oosterhout, C.V; Weetman, D.; Hutchinson, W.F. **Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations**. *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v.6, p. 255–256, 2006.

Ouborg, N.J.; Pertoldi, C.; Loeschcke, V.; Bijlsma, R.; Hedrick, P.W. **Conservation genetics in transition to conservation genomics**. *Trends in Genetics*, Oxford, v. 26, p. 177–187, Apr. 2010.

Paiva, J.R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: Estratégias e novas abordagens**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998. 135p.

Paron, M. E.; Siqueira, J.O.; CURI, N. **Fungos micorrízicos, fósforo e nitrogênio no crescimento inicial da trema e do fedegoso**. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.21, n.4,p.567-574, 1997.

Peakall, R.; Smouse, P. E. **GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update**. *Bioinformatics*, Oxford, v. 28, p. 2537-2539, July 2012.

Peterson, A.T. 2002. **Predicting distributions of Mexican birds using ecological niche modelling methods**. *Ibis* 144: 27-32.

Powell, W.; Machray, G.C.; Provan, J. **Polymorphism revealed by simple sequence repeats.** Trends in plant science, Oxford, v.1, p. 215–222, 1996.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P.J. **Inference of population structure using multilocus genotype data.** Genetics, Bethesda, v. 155, p. 945-959, June 2000.

Quémel, A. R. **Desenvolvimento de locos de microssatélites para *Trema micrantha*.** Manaus, 2015. Dissertação de Mestrado.

Rambaut, A. **FigTree v1.3.1 2006-2009.** 2009.

Ramos, S.L.F.; Macedo, J.L.V.; Lopes, M.T.G.; Batista, J.S.; Formiga, K.M.; Da Silva, P.P.; Saulo-Machado, A.C.; Veasey, E.A. **Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae.** American Journal of Botany, St. Louis, v. 99, p. e508–e510, Dec. 2012.

Ramos, S.L.F.; Lopes, M.T.G.; Lopes, R.; Cunha, R.N.V. da; Macedo, J.L.V.; Contim, L.A.S.; Clement, C.R.; Rodrigues, D.P.; Bernardes, L.G. **Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers.** Crop Breeding and Applied Biotechnology, Viçosa, v. 11, p. 181–185, June 2011a.

Raposo, A.; Ciampi, A.Y.; Wadt, L.H.O.; Veasey, E.A. **Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.42, n. 9, p.1291-1298, Sep. 2007.

Rice, W.R. **Analyzing tables of statistical test.** Evolution, Oxford, v. 43, p. 223-225, Jan. 1989.

Ritland, K. **Infering the genetic basis of inbreeding depression in plants.** Genome, Ottawa, v. 39, p. 1-8, 1996.

Rosenberg, N.A. **Distruct: a program for the graphical display of population structure.** Molecular Ecology Notes, Oxford, v. 4, p. 137-138, June 2004.

Saitou, N.; Nei, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing**

**phylogenetic trees.** *Molecular Biology and Evolution*, Cary, v. 4, p. 406-425, July 1987.

Schoenfelder, T.; Cirimbelli, T. M.; Citadini-Zanete, V. **Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmaceae) on serum glucose levels in normal and diabetic rats.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 3, p. 456-459, 2006.

Siqueira, M.F.; Peterson, A.T. 2003. **Consequences of global climate change for geographic distributions of cerrado tree species.** *Biota Neotropica*, 3(2):1-14.

Slatkin, M. **Estimating level of gene flow in natural populations.** *Genetics*, Bethesda, v. 99, p. 323-335, Feb. 1981.

Smouse, P. E.; Long, J. C.; Sokal, R.R. **Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence.** *Systematic Zoology*, Oxford, v. 35, p. 627–632, Dec. 1986.

Schuelke, M. **An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.** *Nature Biotechnology*, New York, v.18, p. 233–234, Feb. 2000.

Sebbenn, A.M.; Etori, L.C. **Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltrophorum dubium* em teste de progênies misto.** *Revista do Instituto Florestal*. São Paulo, v. 13, n. 22, p. 201-211, 2001.

Setotaw, T. A; Dias, L. A. S.; Missio, R. F. **Genetic divergence among barley accessions from Ethiopia.** *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 10, n. 4, p. 116-123, 2010.

Soares, C. R. F. S.; Siqueira, J.O.; Carvalho, J. G.; Guilherme, L. R. G. **Micorriza arbuscular e nutrição fosfática na toxidez de zinco para a trema [*Trema micrantha* (L.) Blum].** *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v.30, n.4, p.665-675, 2006.

Tarazi, R.; Moreno, M.A.; Gandara, F.B.; Ferraz, E.M.; Moraes, M.L.T.; Vinson, C.C.; Ciampi, A.Y.; Venkovski, R.; Kageyama, P.Y. **High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian Cerrado fruit tree *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae).** *Genetics and Molecular Biology*, v.33, n.1, 2010. p.78-85.



Torres, R. B. **Biologia da reprodução de *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae)**. 1996. 140 f. Tese (Doutorado Biologia Vegetal)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

Trenberth, K.E., 2010. **More knowledge, less certainty**. Nat. Rep. Climate Change 4, 20–21.

Vasconcelos, P. G. A. **Determinantes do desmatamento na Amazônia Brasileira**. Dissertação. Programa de pós-graduação em ciências florestais (UnB). Brasília, 2015. 60 p

Venturin, N.; Souza, P. A.; Venturin, R. P. **Avaliação nutricional da candiúva (*Trema micrantha* (L.) Blume) em casa de vegetação**. Floresta, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1/2, p. 15-26, 2000.

Velásquez, A. et al. 2002. **Patrones y tasas de cambio de uso de suelo en México**. Gaceta Ecológica 62: 21-37.

Weir, B.S.; Cockerham, C.C. **Estimating F-statistic for the analysis of population structure**. Evolution, Oxford, v. 38, p. 1358-1370. Nov. 1984.

Weir, B.S. **Inferences about linkage disequilibrium**. Biometrics Bulletin, Washington, v. 35, p. 235-254, Mar. 1979.

Wright, S. **The genetical structure of populations**. Annals of Eugenics, London, v. 15, p.323-354, July 1951.