

EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL SOBRE
A ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
Esenbeckia leiocarpa Engl. – GUARANTÃ-
UM EXEMPLO DE ESPÉCIE ARBÓREA TROPICAL
CLIMÁTICA DE DISTRIBUIÇÃO AGREGADA

Carlos Eduardo Sícoli Seoane

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas na área de Biologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyam

Campinas
Estado de São Paulo
Agosto 1998

IDADE 80
CHAMADA: TI UNICAMP
Se 61e
C D
RECEB RS 11,00
ATA 13/09/01
* CPE

CM00159493-1

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Seoane, Carlos Eduardo Sícoli

Se 61e S61e Efeitos da fragmentação florestal sobre a estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.-Guarantã- um exemplo de espécie arbórea tropical climática de distribuição agregada/Carlos Eduardo Sícoli Seoane. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
80f.:ilus.

Orientador: Paulo Yoshio Kageyama
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Floresta-conservação. 2. Genética de populações. 3. Florestas tropicais. I. Kageyama, Paulo Yoshio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama



Prof. Dr. Roland Vencovsky



Prof. Dr. Flávio Mães dos Santos

FLAVIO ANTONIO MAËS DOS SANTOS



SUPLENTE:

Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis

AGRADECIMENTOS

Ao Paulo Kageyama, meu orientador, pela oportunidade, amizade e confiança depositada.

Aos Meus pais, que sempre me apoiaram com todo amor possível.

Ao Alexandre Magno Sebbenn, por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho e pela amizade.

À Gelson Dias Fernandes, Israel Gomes Vieira, José Cardoso de Almeida, Patrícia Médici, Maurício Teressa, Glorinha, André Nave e Equipe técnica da E.E. de Caetetés, pela ajuda em campo.

Aos Colegas de Laboratório Helena Maltez, Milene da Silva (minha "herdeira"), Elza Ferraz, Cristina Borges, André Ferretti, Henrique Pedrolli, Cristina Lacerda, João Del Guidice, Flávio Gandara, Nadja Lepsch-Cunha, Beatriz Calheiros, Lina de Souza, Veridiana, Sueli Penteadó, Lúcia Watts, Teresa Grombone, João Dagoberto, Cassio Cezare, Alessandra Reis e todos os demais, pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas da UNICAMP Vidal, Cibele, Márcio, Flávia, Jarbas, Inara, "Inarinha", Marisa, Ricardo, Enrico, Karin, Bel, Main, Mary, Dudu, Simone, Alessandra, Janete, Andréa, Alan, Ingrid, Dedéia e todos os demais, pelas dicas e amizade.

Aos membros da Pré-banca, professores George Shepherd, Maurício dos Reis e Flávio dos Santos, pelas sugestões e comentários que enriqueceram muito minha tese.

Aos amigos da ESALQ/USP, que são muitos, especialmente às meninas da Gaiola, por toda ajuda e amizade.

Aos membros do "Núcleo de Estudos Ambientais Protetores da Floresta", especialmente à Ana Angélica, por segurar as pontas quando da minha ausência e ao vice-presidente, Joel, o "velho da mata", por toda compreensão, dedicação e exemplo de vida.

À Soraya, por me fazer a cada dia mais forte e feliz, com nosso amor, amizade e respeito.

À minha família, especialmente à Augusto, Marta, Cainho, Cátia, Sílvia, Fabiano, Sueli, Sérgio Luís, Sérgio, Maria de Lourdes e Vovó Judith (*in memoriam*), pelo incentivo, apoio e amizade.

À Carolina, Yasmim, Yuri, Paloma, Cauê, Mariana, Rodrigo, Lucas, Mariana, Anahí, Lis, Cecília, Luísa, Gabriel, Kalany e à todas as outras crianças, por existirem.

Ao Instituto Florestal de São Paulo, pela permissão da realização do experimento nas Estações Ecológicas.

À FAPESP, pela concessão de bolsa.

ÍNDICE

RESUMO	01
SUMMARY.....	04
1. INTRODUÇÃO.....	07
1.1. Objetivos	10
1.2. Justificativa	10
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. A espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl	11
2.2. Diversidade genética	12
2.3. Eletroforese de alozimas	15
2.4. Fragmentação Florestal	17
2.5. Conseqüências genéticas da Fragmentação florestal	20
3. HIPÓTESES.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Material	28
4.2. Métodos	30
4.2.1. Amostragem de Campo	30
4.2.2. Amostras para Eletroforese de Aloximas	31
4.2.3. Extração de Isoenzimas	31
4.2.4. Procedimentos de Eletroforese	32
4.2.5. Procedimento de Coloração dos Géis	32
4.2.6. Estrutura Genética	34
4.2.7. Fluxo Gênico	35
4.2.8. Variabilidade Genética Intrapopulacional	36
4.2.9. Taxa de Cruzamento	38
4.2.10. Distribuição Espacial dos Genótipos	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Estrutura Genética	40
5.2. Estimativa de Fluxo Gênico	50
5.3. Diversidade Genética Intrapopulacional	52
5.4. Taxa de Cruzamento	53
5.5. Distribuição Espacial do Genótipos	55
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9. ANEXOS.....	76

RESUMO

Atualmente os planos da conservação biológica devem incluir estratégias de proteção da diversidade genética dentro das espécies, buscando mante-las viáveis à longo prazo. A fragmentação florestal provoca alterações nos padrões de troca de alelos das populações das espécies, causando conseqüências deletérias na diversidade genética. Para elaborar estratégias de conservação genética das espécies arbóreas necessita-se estudar os efeitos da fragmentação sobre a variabilidade e a estrutura genética de determinadas espécies que sirvam como exemplo do comportamento genético de grupos de espécies com características ecológicas semelhantes.

Esenbeckia leiocarpa, ou guarantã, da família das rutáceas, é espécie de fecundação cruzada por miofilia e dispersão autocórica com possível diplocoria, ocorre em freqüência elevada somente em poucas áreas e não é encontrada em formações secundárias. É um exemplo de espécie do grupo sucessional clímax, com alta densidade de indivíduos por hectare e de distribuição agregada.

Utilizou-se tecidos foliares de plântulas de progênies e de indivíduos adultos de dois fragmentos florestais de distintos tamanhos, um de 2.178 hectares (E.E. de Caetetús -fragmento maior) e outro de 76 hectares (E.E. de Ibicatú -fragmento menor). A técnica utilizada foi a eletroforese de isoenzimas na posição horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho.

A hipótese básica postulada foi que em fragmentos de tamanho reduzido os efeitos de deriva genética não seriam contrabalanceados pelo fluxo gênico, o que poderá acarretar em erosão genética.

Dos onze locos avaliados, três foram monomórficos (Pgm-1, Idh-1 e Mdh-2) e oito polimórficos (Skdh-1, 6Pgdh-2, Mdh-1, Mdh-3, Mdh-4, Est-1, Prx-1 e Pgi-2). A comparação entre as freqüências alélicas de adultos e progênies da população do fragmento maior demonstra maiores diferenças do que no fragmento menor. Como este último é constituído de menos subpopulações, pode estar ocorrendo uma homogeneização da população.

Apesar das diferenças observadas entre locos para o F_{IS} e F_{IT} , a média mostra baixa endogamia nas populações, estando estas em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As estimativas da divergência genética média entre populações (F_{ST}) foi de 6,4% mostrando que a variabilidade genética da espécie é mantida principalmente pela variabilidade que existe dentro das populações. Quanto à estrutura genética entre subpopulações da mesma população, no fragmento grande, o F_{SIS} para a média dos locos apresentou excesso de heterozigotos, sendo que a média de F_{SIT} mostra que este excesso é de grandeza diferente nas subpopulações e o F_{SST} foi de 5,1%, indicando pequenas diferenças entre as subpopulações e que a maior parte da variabilidade genética da população é mantida pela variabilidade dentro de subpopulações. No fragmento pequeno o F_{SIS} e F_{SIT} mostram um valor mais semelhante, indicando maior homogeneidade nos níveis de fixação alélicas das subpopulações. Essa baixa diferença deve ocorrer devido ao menor número de subpopulações encontradas.

A estimativa do fluxo gênico (N_m) teve uma média de 1,16 indivíduos por geração entre as subpopulações do fragmento grande, 4,40 entre as subpopulações do fragmento pequeno e 0,91 (adultos) e 1,24 (progênies) entre as duas populações, mostrando uma intensa troca gênica, em especial no fragmento menor. Estes valores para as subpopulações indicam que o fluxo gênico é suficiente para prevenir a diferenciação por deriva genética. O fluxo gênico é maior entre as subpopulações dentro de populações do que entre as populações, as quais estão distantes cerca de 200 km, o que deve restringir a troca alélica, a partir de barreiras geográficas que, combinadas com o isolamento de subpopulações pela fragmentação, possivelmente levará a divergência das populações por deriva genética. O N_b médio foi de 7,31 indivíduos reprodutivos por hectare para as subpopulações do fragmento grande e 27,66 para as subpopulações do fragmento pequeno, onde menos de 27 indivíduos reprodutivos por hectare levaria a erosão genética da população, devido aos efeitos da endogamia. Concordantemente, a estimativa da área de vizinhança (A) foi maior na população menor, onde é requerido um número maior de indivíduos reprodutivos por hectare.

As populações adultas e as progênies amostradas foram polimórficas em 36,36% dos locos amostrados. Os locos segregaram de 1 a 4 alelos, sendo o número médio de alelos por loco (A) de 1,64 para adultos na população do fragmento maior e 1,73 para adultos na população do fragmento menor. As progênies de ambas as populações apresentaram A igual a 2,00. Os valores encontrados nas populações e subpopulações para a heterozigosidade média observada (H_o) quase sempre foram maiores que os da heterozigosidade média esperada (H_e), sugerindo um efeito de seleção a favor de heterozigotos. Porém tais valores são estatisticamente iguais, estando a população em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Principalmente dentro das subpopulações esperava-se um coeficiente de endogamia relativamente alto, decorrente do efeito do fundador. Porém, o índice de fixação foi baixo e não diferente de zero, sugerindo equilíbrio de Hardy-Weinberg para as subpopulações dentro de populações e para as populações. O índice de fixação alélica médio (f) foi muito próximo a zero em quase todas as unidades amostrais. Os resultados das taxas de cruzamento para as duas populações, a nível de famílias nas taxas multiloco (t_m) e uniloco (t_s) mostram que a maioria das famílias foram geradas exclusivamente por cruzamentos. A diferença entre t_m e t_s não foi diferente de zero.

A autocorrelação espacial foi caracterizada pelo Índice I de Moram, utilizando-se o método de classes de distâncias preestabelecidas. Os valores flutuaram em torno de 0, o que indica que a distribuição dos genótipos é aleatória em todas as subpopulações, ou seja, as subpopulações não estão estruturadas na forma de famílias. Esta análise confirma as evidências encontradas nas demais análises deste trabalho, de que as subpopulações não estão estruturadas.

Os dados obtidos sugerem que quanto menos subpopulações existirem em um fragmento, mais a população estará sujeita a perda de variabilidade genética, o que poderá comprometer a sobrevivência local da espécie, à longo prazo. Estes resultados são altamente relevantes para o planejamento das estratégias de conservação, indicando que mesmo para as espécies comuns é necessária a manutenção de grandes áreas em estado natural.

SUMMARY

Currently, conservation plans seek the protection of the genetic diversity within species, in order to maintain their evolutionary viability. Forest fragmentation leads to alterations in allelic exchange patterns of the species, causing deleterious consequences in genetic diversity, compromising their survival. When elaborating genetic conservation strategies for tree species, we need the study of fragmentation effects upon the genetic variability and structure of some species which will indicate the genetic behaviour of groups of species with similar ecological characteristics.

Esenbeckia leiocarpa, popularly known as guarantã, belonging to the Rutaceae plant family, is a species with myophilic pollination syndrome and autochoric dispersion with possible diplochory, occurring in high frequencies only in certain areas, not being found in second growth forests. It is an example for the climax successional group, with high density of individuals per hectare and aggregated distribution. The basic hypothesis was that in smaller fragments genetic drift effects would not be counterbalanced by gene flux, leading to genetic erosion as a consequence.

The experiment used leaf tissues of progenies and adults from two Brazilian Semideciduous Atlantic forest fragments with different sizes, 2178 and 76 hectares. The technique used was allozymes horizontal electrophoresis in a cornstarch gel support.

Of the eleven loci evaluated, three were monomorphic (Pgm-1, Idh-1 e Mdh-2) and eight polymorphic (Skdh-1, 6Pgdh-2, Mdh-1, Mdh-3, Mdh-4, Est-1, Prx-1 and Pgi-2). Comparison of the allelic frequencies of adults and progenies of the larger fragment population showed greater differences than those of the smaller fragment, which is constituted of fewer subpopulations, a fact that may facilitate the population homogenization.

Despite the observed differences between loci for F_{IS} and F_{IT} , the means show low endogamy in the populations, suggesting Hardy-Weinberg equilibrium. The estimates of average genetic divergence between populations (F_{ST}) had a value of 6.4%, showing that the species' genetic variability is maintained mainly by the variability existing inside the populations. In the study of the genetic structure between subpopulations of the same population, in the bigger fragment, the F_{SIS} for the average of the loci showed heterozygotes excess, the average F_{SIT} showed that this excess is of different scale in the subpopulations. F_{SST} was 5.1%, indicating small differences between subpopulations and that the major part of the population's genetic variability is maintained inside the subpopulations. In the smaller fragment, F_{SIS} and F_{SIT} showed a more similar value, indicating greater homogeneity in the subpopulations' allelic fixation levels. This lower difference could be occurring due to the smaller number of existing subpopulations.

The gene flux estimations (N_m) had an average of 1.16 individuals per generation between the subpopulations of the bigger fragment, 4.40 between the subpopulations of the smaller fragment and 0.91 (adults) and 1.24 (progenies) between the two populations, showing an intense gene exchange, especially in the smaller fragment. The values found for the subpopulations indicate that the gene flux is sufficient to prevent differentiation due to genetic drift. The gene flux is higher between the subpopulations in the same population than between populations, which are separated by circa of 200 km, a fact that must restrict genetic exchange, due to geographic and anthropic barriers. This, combined with the reduction of the subpopulations' number due to fragmentation, possibly will lead to populations' divergence due to genetic drift. The Average N_b was of 7,31 hectares for the bigger fragment's subpopulations and 27, 66 for the smaller fragment's subpopulations, where less than 27 reproductive individuals per hectare would make the population undergo genetic erosion, due to endogamic effects. Accordingly, the neighbourhood area estimation (A) was greater in the smaller population, where a higher number of reproductive individuals are required.

The adults populations and the progenies sampled were polymorphic in 36.36% of the loci sampled. The loci segregated 1 to 4 alleles, the average number of alleles per locus (A), for adults, was 1.64 in the bigger fragment population and 1.73 in the smaller fragment population. The progenies of both populations showed a value equal to 2.00. The values found in the populations and subpopulations for average observed heterozygosity (H_o) were almost always greater than those of the average expected heterozygosity (H_e), suggesting a selection favouring heterozygotes. However, these values were statistically equal, which suggests that the populations are in Hardy-Weinberg equilibrium.

A relative high endogamic coefficient was expected, mainly at the intrasubpopulational level, because of the founder effect. However, the fixation index was low and not different from zero, suggesting Hardy-Weinberg equilibrium for the subpopulations inside populations and for the populations. The average allelic fixation index (f) was very close to zero in almost all the units sampled. The results of the single locus (t_s) and multilocus (t_m) rates for both populations, in the family level, show that the majority of the families were generated exclusively by crossing events. The difference between t_m and t_s was close to zero.

Spatial auto-correlation was investigated by the I index of Moran, using prestablished class distances. The values were close to zero, which indicates that the genotype distribution is random in all the subpopulations, i.e., the subpopulations are not family structured. This analysis confirms the evidence found in the other analyse of this experiment, that the subpopulations are not structured.

These data suggest that as fewer subpopulations exist, the more the population will be in danger of losing its genetic variability, which will compromise the species local survival, in the long term. These results are very important for conservation strategies planning, showing the impossibility of *in situ* genetic conservation of tree biodiversity in small fragments, indicating that even for the common species it is necessary to maintain large areas in their natural state.

1. INTRODUÇÃO

Antes da década de 70 a floresta tropical foi considerada como um recurso auto-renovável. O trabalho de GOMEZ-POMPA *et al.* (1972) mostrou evidências de sua não auto-renovabilidade. Desde então, sabe-se que o atual uso do solo nos trópicos e o decorrente desmatamento tem levado à extinção de inúmeras espécies (MYERS, 1991). No Brasil, os desmatamentos florestais cresceram exponencialmente nas décadas de 70 e 80 (FEARNSIDE, 1987). Muitas das florestas tropicais que no passado ocupavam grandes extensões contínuas atualmente encontram-se na forma de pequenos e esparsos fragmentos.

A velocidade dos desmatamentos ocorrentes na floresta tropical é sem precedentes na história evolutiva das florestas tropicais e, assim, tem efeitos profundos no ecossistema (BIERREGAARD *et al.*, 1992). Contudo, os efeitos biológicos e físicos da fragmentação florestal são pouco conhecidos, sendo algumas mudanças facilmente predizíveis, pelo menos qualitativamente. A floresta tropical tem um papel protetor fundamental no balanço do ecossistema global, regional e local e para a conservação dos recursos hídricos e biota; assim, com sua retirada, as condições microclimáticas sofrem mudanças, principalmente nas bordas, e os padrões macroclimáticos locais poderão ser alterados (KAPOS, 1989), assim como a composição de espécies (JANZEN, 1990); os tamanhos das populações serão reduzidos, o que terá conseqüências genéticas deletérias (BIERREGAARD *et al.*, 1992).

A importância das espécies arbóreas é ainda mais relevante quando uma área de floresta é isolada, pois a continuidade da integridade estrutural e biológica da comunidade depende em grande parte das suas características vitais: organismos fixos, autotróficos e de grande longevidade (RANKIN DE MERONA *et al.*, 1990, COSTA 1992), que conferem às espécies arbóreas um papel preponderante no ecossistema, já que a presença das espécies arbóreas formando o dossel e, conseqüentemente, os microclimas do sub-bosque, proporciona inúmeros nichos ecológicos, relações mutualísticas e simbióticas à floresta tropical.

Por outro lado, por essas mesmas características, é difícil de ser avaliado a curto e médio prazos o impacto do isolamento nas espécies arbóreas dos fragmentos. Mesmo quando não existe uma população reprodutiva de uma espécie arbórea capaz de mantê-la presente na comunidade, o fato não é imediatamente evidente, devido a presença de indivíduos adultos daquela espécie; assim uma espécie pode estar efetivamente extinta anos antes da morte do último indivíduo (COSTA, 1992). Os fragmentos florestais de uma região podem dar a impressão inicial de que ainda existe uma amostra da comunidade original que irá se perpetuar, mas a mudança na composição em espécies poderá ser muito grande.

Assim, as pressões antrópicas expansionistas e exploratórias sobre nossas florestas naturais leva-nos à necessidade de estudos sistemáticos dos ecossistemas florestais que ainda restam, a fim de escolher corretamente as estratégias de manejo e conservação a serem implantadas (KAGEYAMA, 1987). A proteção e o desenvolvimento de um ecossistema completo, natural e auto-sustentável deve ser o principal objetivo na tomada de medidas conservacionistas, ao invés da introdução de um grande número de medidas protetoras para espécies individuais (HERMAN *et al.*, 1990; GUNATILLEKE & GUNATILLEKE, 1985)

Uma questão básica para a conservação das florestas tropicais é: "que tamanho e forma deve ter uma reserva para ser eficiente na preservação de espécies?" MacARTHUR & WILSON (1963, 1967) formularam um modelo simples para explicar o número de espécies encontradas em um local, onde este é o resultado de um equilíbrio entre as taxas de imigração e extinção. Tal modelo se adequa razoavelmente bem nos dados de números de espécies, tanto em ilhas verdadeiras quanto em ilhas "virtuais", como os fragmentos florestais, e prediz que, sendo todas as outras condições idênticas, ilhas maiores terão mais espécies que ilhas menores; isto foi usado por conservacionistas para exigir a criação de grandes reservas. Os trabalhos de BIERREGAARD & LOVEJOY (1988, 1989) confirmam a predição desse modelo.

As estratégias de manejo e conservação direcionadas para preservar a variação genética intrapopulacional das espécies arbóreas tropicais têm que considerar a manutenção de várias populações de cada espécie, o que requer grandes áreas destinadas para a conservação. KAGEYAMA & GANDARA (1993), baseados nos dados disponíveis para as espécies muito raras, discutem sobre o tamanho mínimo de área para conservação dos recursos genéticos arbóreos tropicais e concluem que uma área de 500 000 hectares garantiria a perpetuação da biodiversidade arbórea local.

Poucas são as áreas do Domínio da Mata Atlântica que alcançam um tamanho perto de 500 000 hectares e uma forma arredondada, o que garantiria um efeito de borda atenuado; assim, teoricamente, o efeito a longo prazo da fragmentação destas florestas em termos de extinção de espécies, neste caso as arbóreas, é enorme. Assim, é evidente a existência de problemas de congruência entre os limites biológicos e legais de Áreas de Conservação da Floresta Atlântica, considerando como limites biológicos de uma área para conservação os limites hipotéticos que seriam necessários para manter os processos ecológicos e genéticos de um dado conjunto de espécies.

NEWMARK (1985) conclui que é urgente enquanto possível um esforço no sentido de aumentar a congruência entre as fronteiras legais e biológicas das Áreas de Conservação, através do manejo cooperativo das áreas adjacentes, privadas ou não, para amenizar a perda potencial de vida silvestre. Para alcançar tal manejo cooperativo, na região do Planalto Paulista, devido ao atual estado de fragmentação florestal, necessitamos da recuperação de áreas degradadas em grande escala, além de estudos detalhados sobre os fragmentos florestais ainda existentes.

MORAN *et al.* (1989) destacam que há a necessidade da definição de padrões de variabilidade e estrutura genética em plantas para a preparação de estratégias de conservação genética. Para as espécies arbóreas da floresta tropical, os padrões de distribuição espacial (raras, intermediárias e comuns) e os padrões de sucessão ecológica (pioneiras, oportunistas e climácicas) devem ter representantes com variabilidade e estrutura genética bem conhecidas.

1.1. Objetivos

Ao estudar a estrutura genética de populações da espécie arbórea *Esenbeckia leiocarpa* em duas ocorrências naturais, situadas em fragmentos florestais de distintos tamanhos, objetivou-se:

- 1- Quantificar a variabilidade genética intra e interpopulacional;
- 2- Estudar a taxa de cruzamento da espécie;
- 3- Estudar a estruturação espacial dos genótipos dentro das populações;
- 4- Determinar possíveis efeitos da fragmentação florestal sobre a estrutura genética e reprodução;
- 5- Subsidiar diretrizes de manejo e conservação da espécie e da floresta tropical.

1.2. Justificativa

O presente estudo com *Esenbeckia leiocarpa* Engl. preenche uma lacuna nos estudos sobre a conservação das espécies arbóreas nativas do Brasil, servindo como representante para se entender a variabilidade genética das espécies comuns e climáticas de distribuição agregada da floresta tropical. Buscando detectar efeitos do tamanho do fragmento florestal sobre a genética de populações da espécie, estudou-se dois fragmentos florestais de distintos tamanhos onde a ocorrência de *E. leiocarpa* é natural.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

E. leiocarpa ou guarantã, da família das rutáceas, é espécie climácica comum de distribuição espacial agregada e caracteriza-se morfológicamente por apresentar uma altura de 20 a 30 metros, diâmetro a altura do peito (DAP) de 40 a 60 centímetros, folhas simples, glabras, coriáceas, brilhantes, de 10 a 20 centímetros de comprimento por 5 a 8 centímetros de largura, com flores hermafroditas, actinomorfas, branco-esverdeadas, pequenas (3 à 5 mm de diâmetro), rasas e de odor levemente perceptível (CRESTANA *et al.*, 1982).

É árvore semi-decídua, esciófita, característica de floresta latifoliada primária. Não tolera quando jovem a insolação direta, razão pela qual não é encontrada em formações secundárias. Floresce a partir do final de setembro, prolongando-se até janeiro. A maturação do fruto ocorre durante os meses de julho a agosto. Produz anualmente moderada quantidade de sementes viáveis. (LORENZI, 1992).

A espécie apresenta dispersão restrita e descontínua, ocorrendo em frequência elevada somente em poucas áreas, na forma de reboleiras, que podem se estender por centenas de metros. Nas ocorrências naturais estudadas, tais reboleiras eram formadas por dezenas de indivíduos adultos.

CRESTANA *et al.* (1982) apresentam dados sobre a biologia floral, ecologia de polinização e sistema reprodutivo de *E. leiocarpa*. O conjunto de características florais se ajusta à síndrome de miofilia; com a não formação do fruto pelas flores isoladas, os autores detectaram a existência de auto-incompatibilidade, havendo então fecundação cruzada obrigatória, o que leva a espécie a ser alogâmica. A morfologia dos frutos e sementes dão indicações dos meios de dispersão: o fruto explosivo de *E. leiocarpa* se encaixa na síndrome de autocoria descrita por HOWE & SMALLWOOD (1982). A autocoria é um dos processos menos eficientes de dispersão, em termos de distância. Estudos preliminares do Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas- ESALQ/USP com os frutos de *E. leiocarpa* mostraram que o fruto pode ser lançado até 5 metros de distância da planta mãe. As sementes de *E. leiocarpa* fornecem uma recompensa em potencial para possíveis dispersores, podendo ocorrer diplocoria.

Esenbeckia leiocarpa, apesar de planta da floresta clímax, é apropriada para o adensamento das matas degradadas de áreas de preservação permanente. A madeira de *E. leiocarpa* é muito forte, sendo o significado de guarantã, em tupi-guarani, "madeira forte" (TIBIRIÇÁ, 1984). Assim sua madeira é usada em obras externas, como postes, dormentes, moirões, estivas, esteios, vigas de pontes e na construção civil, como vigas, caibros, ripas, batentes de portas e janelas, tábuas e tacos para assoalhos, cabos de ferramentas, entre outros (LORENZI, 1992).

A alta densidade local natural das populações da espécie indica uma provável tolerância a consórcios altamente adensados com a espécie, o que é muito conveniente para plantios para exploração madeireira. Contudo, tal prática é dificultada pelo lento crescimento dos indivíduos da espécie. Também encontraram-se, nas folhas de *E. leiocarpa*, alcalóides com propriedades contra as larvas de *Pectinophora gossypiella*, uma praga do algodão (*Gossipium* spp.) (NAKATSU *et al.*, 1990).

2.2. Diversidade genética

Atualmente a proteção da diversidade genética dentro das espécies em geral é uma prioridade inerente aos planos da conservação (BARRET & KOHN, 1991), sendo o objetivo a longo prazo manter a viabilidade das espécies. Já que as características genéticas irão influenciar as performances fisiológicas e demográfica das populações, a base para a evolução das espécies concentra-se na variação genética (FOSTER & RAHS, 1985).

Muitas espécies arbóreas possuem efetivos meios de dispersão de genes e com isso mantêm altos níveis de variação genética dentro de populações, com pouca diferenciação genética entre populações (HAMRICK *et al.*, 1979; HAMRICK, 1983; LOVELESS & HAMRICK, 1987).

A floresta tropical úmida é sem dúvida o ecossistema terrestre de maior diversidade de espécies e complexidade de relações ecológicas, sendo um modelo de difícil entendimento para a conservação de seus recursos genéticos *in situ* KAGEYAMA (1987). Além do mais, nestes ecossistemas, poucos estudos sobre a diversidade genética foram realizados, sendo este o maior desafio existente aos conservacionistas de recursos genéticos. Até hoje, a estrutura genética em uma região geográfica ampla das espécies arbóreas dos neotrópicos é praticamente desconhecida (CHASE *et al.*, 1995).

O entendimento da estrutura genética das espécies de ocorrência nos fragmentos remanescentes é fundamental para o estabelecimento de critérios adequados no uso destas populações para a recomposição dos ecossistemas florestais, objetivando a manutenção de sua biodiversidade. Além de se conhecer a diversidade das espécies, necessita-se também conhecer a variação genética entre e dentro de populações.

A diversidade genética ou a variabilidade devida a diferenças nos alelos pode ocorrer a diferentes níveis: a) de espécies dentro de ecossistemas, b) de populações dentro de espécies; e c) de indivíduos dentro de populações de espécies. A caracterização destes níveis de diversidade é básica para o planejamento das estratégias de conservação genética (KAGEYAMA, 1987).

O estudo da variabilidade genética em populações naturais envolve duas questões básicas: a primeira é descrever os níveis de variabilidade genética mantida dentro das populações de espécies, e a segunda, de particular importância para a conservação genética, é como a variabilidade genética é distribuída entre e dentro de populações.

HAMRICK (1983), em estudo de várias populações naturais de espécies arbóreas tropicais, concluiu que a variabilidade entre e dentro de populações é afetada diretamente pelo sistema de reprodução da espécie e o mecanismo de dispersão das sementes, além do tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica da espécie e o tipo de comunidade em que a espécie normalmente ocorre.

HAMRICK & GODT (1990), com base na literatura de 653 estudos de alozimas, observaram os dados genéticos de 449 taxas, que envolviam plantas herbáceas, arbóreas e arbustivas, visando relacionar os níveis de diversidade com a ecologia das espécies. Em média as plantas apresentaram 50% dos locos polimórficos, uma heterozigozidade média esperada de 0,149 e o número de alelos por loco variou de 1,5 a 3,0. Verificaram que, para as espécies arbóreas tropicais, a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro de populações e que os dados revelam variações expressivas nos níveis de diversidade genética, na porcentagem de locos polimórficos e no número de alelos/loco. Concluem que o sistema reprodutivo e a distribuição geográfica foram os fatores que mais contribuíram para a variabilidade genética entre e dentro de populações, como mencionado anteriormente (HAMRICK, 1983).

O trabalho BAWA (1973) foi o primeiro a detectar o alto grau de alogamia nas espécies arbóreas tropicais; em alguns casos, porém, a endogamia pode ter uma importância maior no sistema de cruzamento, como no caso de *E. leiocarpa*.

A organização dos níveis de variabilidade genética entre e dentro de populações é referenciada como estrutura genética e é decorrente de fatores tais como: sistema reprodutivo, níveis de endogamia, seleção natural, fluxo gênico e deriva genética entre e dentro de populações. Tais fatores podem explicar o comportamento de alelos nas populações (WRIGHT, 1943).

HAMRICK *et al* (1993) consideram que espécies com baixa densidade de indivíduos adultos têm maior heterogeneidade genética espacial devido a dispersão de sementes, se comparadas com as espécies de alta densidade, ou seja, este fato é menos freqüente em espécies com dispersão de sementes restrita onde as plântulas têm probabilidade maior de serem recrutadas nas proximidades de suas matrizes.

HILL *et al.* (1978), em estudo da variabilidade genética de espécies leguminosas ao longo do Rio Solimões, na Amazônia, observaram que os índices de heteroziguidade e de similaridade genética, os padrões demográficos e a biologia indicam estreita correlação entre variabilidade genética e a estratégia adaptativa. As populações com alta probabilidade de extinção são mais homozigotas que as com maior probabilidade de sobrevivência, isto é, populações que sofrem perturbações são mais homozigotas.

2.3. Eletroforese de Alozimas

A possibilidade de contar o número de locos com variação, verificar número de alelos e distinguir homozigotos de heterozigotos tornou-se efetiva com a codificação dos locos de proteínas, especialmente as enzimas. A técnica mais comum para distinguir diferentes formas genéticas (alozimas) de uma enzima é a eletroforese em gel (FUTUYMA,1992).

O método bioquímico de alozimas é uma técnica rápida, prática e adequada para o estudo genético de populações naturais. Este método permite a obtenção de informações sobre a estrutura genética das populações em um período de estudo relativamente curto, não necessita de implantação de experimento, possibilita ensaios com várias populações e apresenta um custo equivalente aos métodos quantitativos, além das enzimas serem a expressão direta dos genes, aumentando desta forma a exatidão das estimativas dos parâmetros genéticos, sem influência do ambiente.

MORAES (1993), estudando a variabilidade genética de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) tanto por alozimas quanto por caracteres quantitativos, obteve como conclusão que o resultado obtido através das características quantitativas apresentou-se próximo ao obtido pelo método de alozimas.

CORDER & LOPES (1993), estudando árvores adultas e progênes de *Eucalyptus spp.*, concluíram que as análises genéticas pelos métodos eletroforéticos podem ser realizadas em qualquer fase de sua existência, desde que se conserve os indivíduos vivos em condições de campo e viveiro, tornando possível analisar com maior precisão o controle genético dos locos envolvidos. Isso é possível já que teremos genótipos maternos (árvores adultas) e suas progênes, facilitando a compreensão dos estudos de genética de populações, do sistema reprodutivo, do fluxo gênico, sendo também uma valiosa ajuda no monitoramento genético de populações melhoradas.

O uso da eletroforese de alozimas para descrever a distribuição da variação genética apresenta algumas vantagens, como: i) herança genética dos traços detectados eletroforéticamente podem ser facilmente demonstrados e ii) a maioria dos locos de alozimas são codominantes e iii) a frequência alélica pode ser calculada sem a necessidade de cruzamentos genéticos (HAMRICK *et al.*, 1979).

O princípio básico geral da eletroforese consiste na colocação de extratos de diversos indivíduos num gel poroso e na migração dos íons em solução nestes extratos, ao serem submetidos a ação de um campo elétrico, migrando no sentido do eletrodo de sinal contrário ao seu. A diferenciação na composição de aminoácidos, no tamanho, na forma e nas cargas elétricas conferem às enzimas diferentes taxas de movimentação, de modo que tendem a se separar no gel. Suas posições são encontradas através de sistemas específicos de coloração, permitindo a formação de certos padrões (zimogramas) passíveis de interpretação (ALFENAS *et al.*, 1991; FUTUYMA, 1992).

Para o estudo de locos alozimáticos pressupõe-se, a princípio, a representatividade dos mesmos do genoma como um todo e a neutralidade, ou seja, estes locos não estão sujeitos diretamente as forças seletivas. TORGGLER *et al.* (1994) e REIS (1996) apresentam discussões mais detalhadas sobre o assunto.

ALFENAS *et al.* (1991) descrevem o método de eletroforese de alozimas com detalhes para essências florestais. MORAES (1993) por sua vez, faz um levantamento dos sistemas enzimáticos mais utilizados em coníferas e angiospermas, citando para as últimas a MDH, AAT, LAP, PER, PGI, PGM, SKDH, ACP, G6PD, IDH e EST.

Internacionalmente, vários pesquisadores têm utilizado as técnicas de eletroforese de alozimas em estudos visando a conservação e manejo das florestas naturais: HAMRICK *et al.* (1979), HAMRICK (1983, 1987), HAMRICK & LOVELESS (1986, 1989), HAMRICK & MURAWSKI (1991), LOVELESS & HAMRICK (1987), BUCKLEY *et al.* (1988) e HALL *et al.* (1996).

Várias espécies arbóreas brasileiras foram estudadas com esta técnica, destacando-se os trabalhos de MORAES (1993), GANDARA (1995), REIS (1996), LEPSH-CUNHA (1996), SEBBENN (1997), LACERDA (1997) MALTEZ (1997) e SOUZA (1997). As espécies arbóreas brasileiras que foram estudadas quanto a sua genética de populações são de baixa densidade local (raras) e secundárias na sucessão natural, excetuando *Euterpe edulis*, estudada por REIS (1996), que é comum localmente, do grupo sucessional clímax e apresenta distribuição agregada na Floresta Atlântica Mesófila Semidecídua.

2.4. Fragmentação Florestal

HOWE (1984) estudou as implicações da dispersão de sementes para o manejo da floresta tropical e constatou que muitas árvores têm sua dispersão de sementes feita por animais que dependem de seus frutos por pelo menos parte do ano. Alguns destes sistemas mutualistas são pivotais para a comunidade, pois algumas destas árvores frutificam no período de escassez, mantendo as espécies animais, vetores para a dispersão e recrutamento de muitas outras espécies vegetais em outras épocas do ano. A ausência, em determinado fragmento florestal, destas espécies-chave para o funcionamento do ecossistema florestal, pode acarretar em muito mais que sua própria extinção e assim sua conservação é uma linha de pesquisa bastante abordada ultimamente (FRANKIE *et al.*, 1990).

TERBORGH (1992) lembra que como os grandes predadores necessitam de grandes espaços para encontrar suas presas em número suficiente, eles desaparecerão em florestas fragmentadas à partir de um tamanho mínimo, e isso terá um efeito desestabilizador em populações de consumidores primários, entre eles os predadores e eventuais dispersores de sementes, o que por sua vez deverá afetar a composição de árvores da floresta. SMART *et al.* (1985) detectaram mudanças na vegetação devido à ausência de pisoteio e herbivoria de grandes mamíferos em Uganda. TERBORGH (1990) comparou a densidades de animais que são presas de grandes felinos na floresta de Barro Colorado Island (BCI) - Panamá, onde os grandes predadores foram extintos, com a de Cosha Cashu - Peru, onde há populações preservadas destes, e encontrou valores de densidade 10 à 20 vezes maiores para BCI.

No Brasil, um trabalho de relevância que contempla o estudo dos efeitos da fragmentação florestal é o Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF), que desde 1981 observa as alterações sucedidas na flora e na fauna de alguns fragmentos de diversos tamanhos de floresta Amazônica de terra firme, em comparação com a floresta contínua. Tal projeto envolve diversas pesquisas no campo da biologia, tais como: a inter-relação entre animais, as alterações microclimáticas, a demografia de plantas, a dinâmica de populações de animais e a relação com a biodiversidade (KAPOS, 1989). Das espécies arbóreas aí ocorrentes, apenas 2 espécies de *Couratari* (LEPSH-CUNHA, 1996) foram estudadas do ponto de vista da genética de populações.

Na Região Sudeste brasileira, um ecossistema que representa de maneira crítica este modelo de paisagem fragmentada é a Floresta Mesófila Semidecídua, também conhecida como Floresta do Planalto, que faz parte da Floresta Atlântica *latu sensu*. Ocupa trechos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás e é abrigo de uma rica diversidade de espécies, tendo sua estrutura e composição distintas das florestas Amazônica e Atlântica *strictu sensu* (LEITÃO-FILHO, 1987), sendo assim um bom alvo para estudos visando a conservação.

Os trabalhos de VIANA e colaboradores (VIANA et al., 1992; VIANA, 1995) envolvem a sucessão florestal e a biodiversidade de fragmentos da Floresta Mesófila Semidecídua do interior de São Paulo. Fatores tais como o histórico de perturbação de fragmentos, seu tamanho e sua forma, seu nível de isolamento, seu tipo de vizinhança e o tipo do ecossistema são apontados como aspectos que influenciam e estrutura da comunidade de plantas (VIANA, 1995).

VIANA *et al.* (1992), estudando fragmentos florestais do interior do Estado de São Paulo, concluem que: i) Grande parte dos fragmentos são pequenos e isolados; ii) A ocorrência de cipós em alta densidade dificulta a regeneração natural da espécies arbóreas; iii) A frequência de árvores mortas é alta; iv) O efeito de borda é significativo e complexo e v) Os fragmentos necessitam de manejo para evitar o prosseguimento do processo atual de degradação e perda de biodiversidade. Qual o manejo mais adequado continua uma questão em aberto. Em VIANA (1995) é enfatizada a necessidade de se considerar os fragmentos florestais pequenos, isolados e não sustentáveis como remanescentes de uma rica e ameaçada biodiversidade e, portanto, merecedores de uma abordagem séria, priorizando o manejo e conservação destas unidades.

Grande parte dos estudos de conservação de fragmentos florestais baseia-se principalmente em conhecimentos ecológicos e demográficos, não contendo o enfoque genético, essencial para que a elaboração de estratégias de manejo seja bem sucedida. São raros os casos de espécies estudadas do ponto de vista genético, sendo estes indispensáveis à exploração racional, à recuperação e, principalmente, à conservação da floresta tropical.

2.5. Conseqüências genéticas da Fragmentação florestal

Um dos processos mais importantes a ser considerado para a conservação das florestas tropicais ainda passa quase despercebido ao homem comum: as conseqüências deletérias na diversidade genética das espécies causadas pela fragmentação florestal. A principal conseqüência deste processo no tocante à genética é que as espécies têm sua sobrevivência comprometida devido às alterações nos padrões de troca de genes (BALLAL *et al.* 1994).

Algumas das ferramentas básicas para os estudos de genética de populações de plantas consistem no conhecimento do sistema reprodutivo e de acasalamento, do fluxo gênico intra e inter-populacional, de distribuição espacial dos indivíduos e, principalmente, da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações das espécies que compõem as comunidades em estudo (KAGEYAMA, 1987).

GRANT (1980) afirma que a entrada constante e alta de genes em uma população através do fluxo gênico é o fator mais importante na manutenção da coesão genética entre as populações de uma espécie. ELLSTRAND & ELLAN (1993) reforçam que o fluxo gênico é considerado benéfico por prevenir a depressão endogâmica e a depleção da variabilidade genética em pequenas populações. Segundo estes autores, para a maioria das espécies perenes, o aumento do fluxo gênico em apenas duas décadas é suficiente para anular o efeito da deriva e da endogamia.

A diversidade e a estrutura genética podem ser alteradas se a fragmentação florestal modificar os padrões de dispersão do pólen e sementes (FORÉ *et al.*, 1992). A fragmentação de habitats também pode colaborar para modificações no sistema de reprodução, alterando a composição dos agentes polinizadores ou seus comportamentos (SOUZA, 1997).

Mosaicos de habitats, incluindo manchas de ecossistemas nativos, fragmentos antropogênicos e áreas agrícolas e urbanas apresentam probabilidades desprezíveis de dispersão e estabelecimento de adultos e juvenis de parte da fauna (SANTOS, 1995), esta responsável por grande parte do fluxo gênico das plantas, ao atuarem como polinizadores e dispersores de sementes. O atual estado fragmentado das florestas do Estado de São Paulo afeta o fluxo gênico de muitas espécies nativas e as põem em risco de extinção. As espécies ocorrentes nos fragmentos do Planalto Paulista teoricamente estão sofrendo o efeito de erosão genética, devido à redução de suas populações, ou seja, algumas destas espécies perderão parte de sua variabilidade genética natural, principalmente na forma de alelos raros que não estão representados nos genes dos indivíduos remanescentes nos fragmentos. As espécies arbóreas com indivíduos muito espaçados provavelmente são as mais afetadas pela fragmentação florestal, podendo mesmo ter nenhum indivíduo presente em um fragmento florestal de uma região onde ocorria a espécie.

A fragmentação dos ecossistemas naturais é um fenômeno que ocorre em escala mundial e suas conseqüências estudadas para os mais diferentes taxa: BOITANI (1984) - mamíferos da Europa; BANSE & BEZZEL (1984) e DMOWSKI & KOZAKIEWICZ (1990) - aves da Europa; DA SILVA (1988) - *Grisea grisea*, ave da Amazônia; JOHNSIGH *et al.* (1990)- elefantes e tigres da Índia; ABRAMS (1985) - aves da África do Sul; MENGES & GAWLER (1986), TABACCHI *et al.* (1990), HERMAN *et al.* (1990) - espécies animais da mata ciliar; SAUNDERS (1990), MANSERGH & SCOTTS (1989) e LAWRENCE (1990) - mamíferos da Austrália; HEINEN & MERRIAM (1990), MERRIAM & LANOUE (1990), LORENZ & BARRETT (1990), PRICE & LONGLAND (1989), BLEICH *et al.* (1990); THOMAS & IRBY (1990) e FOSTER & RAHS (1985) - mamíferos da América do Norte; CONRY (1989) - búfalo *Bos gaurus* da Malásia; BRENNAN (1985) - macacos (*Cercopithecus neglectus*) do Quênia; SZACKI (1987) - mamíferos da Europa; SAUNDERS (1990) - Cracatua (*Calyptorhynchus funereus*) da Austrália; MENGES (1990) - *Pedicularis furbishiae*, uma planta perene da América do Norte; DE-VIEDMA *et al.* (1985) e WOOD & SAMWAYS (1991) – lepdópteros da Europa; HALL *et al.* (1996) - *Pithecellobium elegans*, árvore tropical rara da Costa Rica.

Na literatura, as predições iniciais sobre as consequências genéticas da fragmentação de habitats enfocavam o tamanho populacional reduzido e o isolamento populacional (SOUZA, 1997). A importância do tamanho populacional relacionada à estrutura de cruzamento, genética e evolução foi primeiramente reconhecida por WRIGHT (1946). Os estudos mais recentes discutem sobretudo aspectos da variabilidade genética, níveis de endogamia, fluxo gênico e divergência interpopulacional (YOUNG *et al.*, 1996)

Em síntese, a fragmentação florestal pode causar a perda da variação genética por duas vias. Primeiro, a redução do tamanho populacional cria gargalos genéticos ("bottlenecks") porque os indivíduos que ficam contêm apenas uma pequena amostra do "pool" gênico original. Em segundo lugar, como consequência, a pequena população remanescente, caso permaneça isolada por muitas gerações, terá contínua perda de alelos devido à deriva genética aleatória (SOUZA, 1997).

Teoricamente, as alterações decorrentes da fragmentação florestal contribuem para a erosão da variação genética e aumento da divergência genética entre populações, através dos seguintes eventos: a) aumento da deriva genética, b) aumento da endogamia, c) redução do fluxo gênico e d) aumento da probabilidade de extinção local. Tais efeitos apresentam implicações em relação à persistência da espécie. A curto prazo, a perda de heterozigotidade pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional. A longo prazo, a redução da riqueza alélica deve limitar a habilidade das espécies a responderem às mudanças devidas à ação de forças seletivas. (YOUNG *et al.*, 1996, ELLSTRAND & ELLAN, 1993, CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 1987)

Dados provenientes de estudos com alozimas sugerem que a redução do tamanho populacional e isolamento das populações causam redução da variabilidade genética (BILLINGTON, 1991; POLLANS & ALLARD, 1989; SAUNDERS, 1990; WILCOVE, 1987). Os dados desses trabalhos sugerem que a perda genética verificada deve-se mais ao efeito de gargalo do que à deriva genética (YOUNG *et al.*, 1996).

Outra consequência é a ocorrência de endogamia ou cruzamento entre indivíduos aparentados. A perda de vigor decorrente da endogamia é conhecida como depressão endogâmica. Este fenômeno é mais estudado em animais, e ainda pouco se conhece sobre seu efeito em plantas, porém sabe-se que a endogamia reduz a performance reprodutiva das espécies (TEMPLETON *et al.*, 1990). A endogamia acarreta em uma diminuição dos níveis de variação genética, resultando numa baixa taxa de recrutamento e potencial risco de extinção (HAMRICK & LOVELESS, 1986). Quase sem exceção, a endogamia forçada, que pode ocorrer pela falta de indivíduos da mesma espécie ou pela falta do agente polinizador, ou ainda pelo cruzamento de indivíduos muito aparentados, resulta em deterioração geral do vigor e o aparecimento de outros efeitos adversos (ALLARD, 1971).

A endogamia tem como consequência genética a homozigose dentro de populações. Em plantas, a endogamia ocorre por autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados. A autofecundação é o extremo da endogamia e é evitada em muitas plantas por mecanismos como auto-incompatibilidade ou por dioiccia. Endogamia biparental é mais freqüente quando as populações são pequenas ou quando exibem estrutura genética espacial. Esta estrutura é desenvolvida quando a dispersão de pólen e sementes é restrita (ELLSTRAND & ELLAN, 1993).

A redução aleatória drástica do número de indivíduos de uma espécie em um certo local num determinado tempo é designado de gargalo ("bottleneck"). O gargalo contribui para a perda de alelos, especialmente os raros (BARRET & KOHN, 1991; SOUZA, 1997). HAMRICK & MURAWSKI (1991) afirmam que populações que estão pequenas por algumas gerações, ou que sofreram o efeito de gargalo recentemente, devem ter uma menor variabilidade genética que populações que estão grandes e estáveis por algumas gerações.

Contudo, o mesmo fator que gerou o efeito de gargalo pode acarretar em forças seletivas que contrabalançam a perda de variabilidade genética gerada pelo efeito de gargalo, como, por exemplo, uma seleção favorecendo indivíduos heterozigotos. BARRET & KOHN (1991), com base no trabalho de NEI (1975), salientam que a quantidade da redução da heterozigozidade média por loco não depende apenas do tamanho do gargalo, mas também das taxas de cruzamento e crescimento da população. Caso estas cresçam rapidamente, a redução da heterozigozidade é mínima, mesmo que o número de fundadores seja pequeno.

Em contraste, a perda do número médio de alelos por loco é profundamente afetado pelo tamanho do gargalo. Em geral a perda de alelos excede muito a perda da heterozigozidade média, embora com o tempo a perda de variabilidade genética se tornará significativa.

Por sua vez, a deriva genética muda a distribuição da variabilidade genética de duas formas: diminui a variabilidade dentro de populações, refletindo na perda de heterozigozidade e de alelos, e aumenta a diferenciação entre populações. A diminuição da heterozigozidade pode estar refletida diretamente na redução de genes nos remanescentes pequenos, ou pela erosão da heterozigozidade quando a endogamia acompanha a fragmentação (BARRET & KOHN, 1991; ELLSTRAND & ELLAN, 1993; BALLAL *et al.*, 1994).

Dada uma estrutura estável e assumindo um modelo de fluxo gênico de ilhas, a divergência genética interpopulacional aumentará devido à deriva, particularmente quando o fluxo gênico for menor que 1. Em contraste, apenas uma pequena quantidade de fluxo gênico, equivalente a um indivíduo por geração, é requerida para reduzir a perda de alelos (TEMPLETON *et al.*, 1990; YOUNG *et al.*, 1996).

Onde as populações são pequenas e isoladas umas das outras, a deriva genética terá uma influência dominante na estrutura genética. Estas populações estão sujeitas à perda de variabilidade e tornam-se potencialmente em risco de extinção. Quando as populações tornam-se pequenas por um período de tempo longo os efeitos da amostragem são acumulativos. As mudanças nas frequências genotípicas são aleatórias devido às amostras de gametas de uma geração para a outra.

Em grandes populações tem-se pouco efeito de deriva. Em populações pequenas, com menos de 100 indivíduos, as frequências genotípicas podem sofrer grandes flutuações em diferentes gerações, levando à perda de alelos (BARRET & KOHN, 1991). O efeito da deriva pode ser amenizado quando o fluxo gênico entre ilhas permanece, mesmo que os níveis do fluxo gênico sejam baixos (TEMPLETON *et al.*, 1990; ELLSTRAND & ELLAN, 1993; YOUNG *et al.*, 1996).

As predições teóricas indicam que as conseqüências da deriva dependem do número de gerações que se passaram nos remanescentes; as espécies com gerações que se procedem em curto espaço de tempo, tais quais as herbáceas anuais, mostram grande perda de variação oriunda da deriva. Quando se tem poucas gerações, os resultados observados se devem ao efeito de gargalo genético (YOUNG *et al.*, 1996).

Trabalhos que comparem a estrutura genética de populações da mesma espécie em locais com intensidades de perturbação antrópica diferentes ainda são raros (DUCOUSSO *et al.*, 1990), havendo dois trabalhos na literatura abordando este aspecto para *populações* de espécies arbóreas tropicais: o de HALL *et al.* (1996) e o de SOUZA (1997).

O trabalho pioneiro de HALL *et al.* (1996), desenvolvido na Costa Rica, encontrou que a variação genética foi menor em populações de menor tamanho da espécie arbórea rara *Pithecellobium elegans* e mais longes da floresta contínua, sendo que 10% da variação genética total observada para a espécie deve-se à diferenciação entre amostras coletadas em fragmentos pequenos e na floresta contínua. Os autores citados concluem que a fragmentação do que foi uma vez uma vasta área de floresta com *Pithecellobium elegans* está se convertendo em populações pequenas ilhadas e geneticamente erodidas.

SOUZA (1997) estudou os efeitos da fragmentação florestal na variabilidade genética de *Chorisia speciosa* através de locos alozímicos, ao comparar os parâmetros genéticos de quatro populações naturais, sendo uma representando um fragmento comparativamente grande e não perturbado (com área de 287,28 hectares) e três representando fragmentos florestais pequenos e perturbados (com área de 10, 25 e 50 hectares), todos na região de Bauru - SP. A espécie apresentou altos valores relativos aos índices de diversidade em todos os fragmentos, não havendo perda significativa de heterozigozidade da população fonte para as populações fragmentadas. Conforme as previsões teóricas, a deriva genética ficou evidenciada pela perda, fixação e oscilação aleatória de alelos e também pela alta divergência interpopulacional ($F_{st}=0,183$). Nos fragmentos pequenos e perturbados foram detectados três fenômenos, tanto para alelos raros quanto para comuns, característicos da deriva genética: perda e fixação de alelos e oscilações aleatórias das frequências alélicas. Os gargalos artificiais criados na população do maior fragmento mostraram que a perda genética se refletiu nas distribuições alélicas, através das perdas e oscilações de frequências de alelos raros e não se refletiu nas heterozigozidades, o que foi esperado, já que mostrou-se não haver existência de estruturação espacial nas populações estudadas da espécie.

A autora conclui que i) A maior consequência genética da fragmentação florestal é a perda da variação genética, que neste estudo refletiu nas mudanças das distribuições alélicas e não foi evidenciada nos índices de diversidade, ii) Em poucas gerações (50 anos de fragmentação) se evidenciou perda genética e iii) Para ampliar a compreensão dos fenômenos de perda genética que ocorre nos fragmentos pequenos e perturbados, seria importante trabalhar com senso demográfico ao invés de amostragem e proceder amostras separadas de indivíduos jovens (banco de plântulas da floresta ou através da coleta de sementes e obtenção de progênies) e adultos, já que os jovens, por serem representativos natos de eventos reprodutivos pós-fragmentação, refletem melhor as perdas genéticas (SOUZA, 1997).

3. HIPÓTESE

E. leiocarpa é uma espécie arbórea, climácica e comum, de dispersão primária autocórica, polinização miofilica e que ocorre naturalmente agrupada em reboleiras (subpopulações). Como seus polinizadores são de vôo curto e a autocoria é o método menos eficiente de dispersão, em termos de distância, é esperado uma certa estrutura genética espacial dentro das subpopulações, ou seja, que os indivíduos dentro destas unidades apresentam um maior grau de parentesco entre si, do que entre subpopulações. Entretanto, mesmo com um certo grau de estrutura genética espacial, os possíveis efeitos da deriva genética seriam contrabalanceados pelo fluxo gênico entre as muitas subpopulações que constituem a população em ambientes naturais ou fragmentos maiores.

Considerando que importante fração da variabilidade genética das populações é dada pelo grande número de subpopulações, é esperado que em fragmentos de tamanho reduzido, com um pequeno número de subpopulações, os efeitos de deriva genética não sejam contrabalanceados pelo fluxo gênico, que ficará restrito ou preferencial entre as poucas subpopulações restantes, o que poderá acarretar em erosão genética.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

O trabalho foi realizado em dois fragmentos florestais onde a ocorrência de *E. leiocarpa* é natural: na Estação Ecológica de Caetetés e na Estação Ecológica de Ibicatú, ambas do Instituto Florestal do Estado de São Paulo. Como citado anteriormente, a espécie têm uma distribuição espacial de indivíduos agregada, sendo o agregado de indivíduos adultos popularmente denominado de reboleira, considerada neste trabalho como uma subpopulação da espécie. Em cada um dos fragmentos florestais foram avaliadas duas subpopulações.

O fragmento florestal constituído pela Estação Ecológica de Caetetés, de 2.178 hectares, localiza-se entre a Latitude 22°22' e 22°27' S e Longitude de 49°40' a 49°43' W, entre os municípios de Gália e Alvinlândia-SP, com altitude variando entre 500 a 600 m. O clima, segundo a classificação de Köppen é do tipo Cwa (Quente com inverno seco). A temperatura máxima anual é de 30° C, mínima de 10° C e média de 20° C. A precipitação anual é de 1.480 mm e está concentrada nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, sendo maio e junho os meses mais secos do ano (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 1987).

A Estação Ecológica de Ibicatú é um fragmento florestal de 76 hectares, localiza-se entre a Latitude 22°47' e 22°48' S e Longitude de 47°49' a 47°50'W, no Município de Piracicaba-SP, com altitude média de 500 m. O clima, segundo CATHARINO (1989), citado em COSTA (1992), pelo Sistema de Thornwaite, é do tipo úmido, com uma pequena concentração da evapotranspiração potencial no verão. A precipitação anual situa-se acima de 1.000 mm (Figura 1).

Na E.E de Caetetés, onde encontrou-se subpopulações distantes uma da outra até quatro mil metros, as subpopulações amostradas distanciavam-se cerca de dois mil metros. Na E.E. de Ibicatú, onde encontrou-se subpopulações distantes uma da outra até oitocentos metros, as subpopulações amostradas distanciavam-se cerca de quatrocentos metros. Assim, a diferença de distância entre as subpopulações amostradas reflete a distância ocorrente entre as demais subpopulações existentes nos fragmentos.

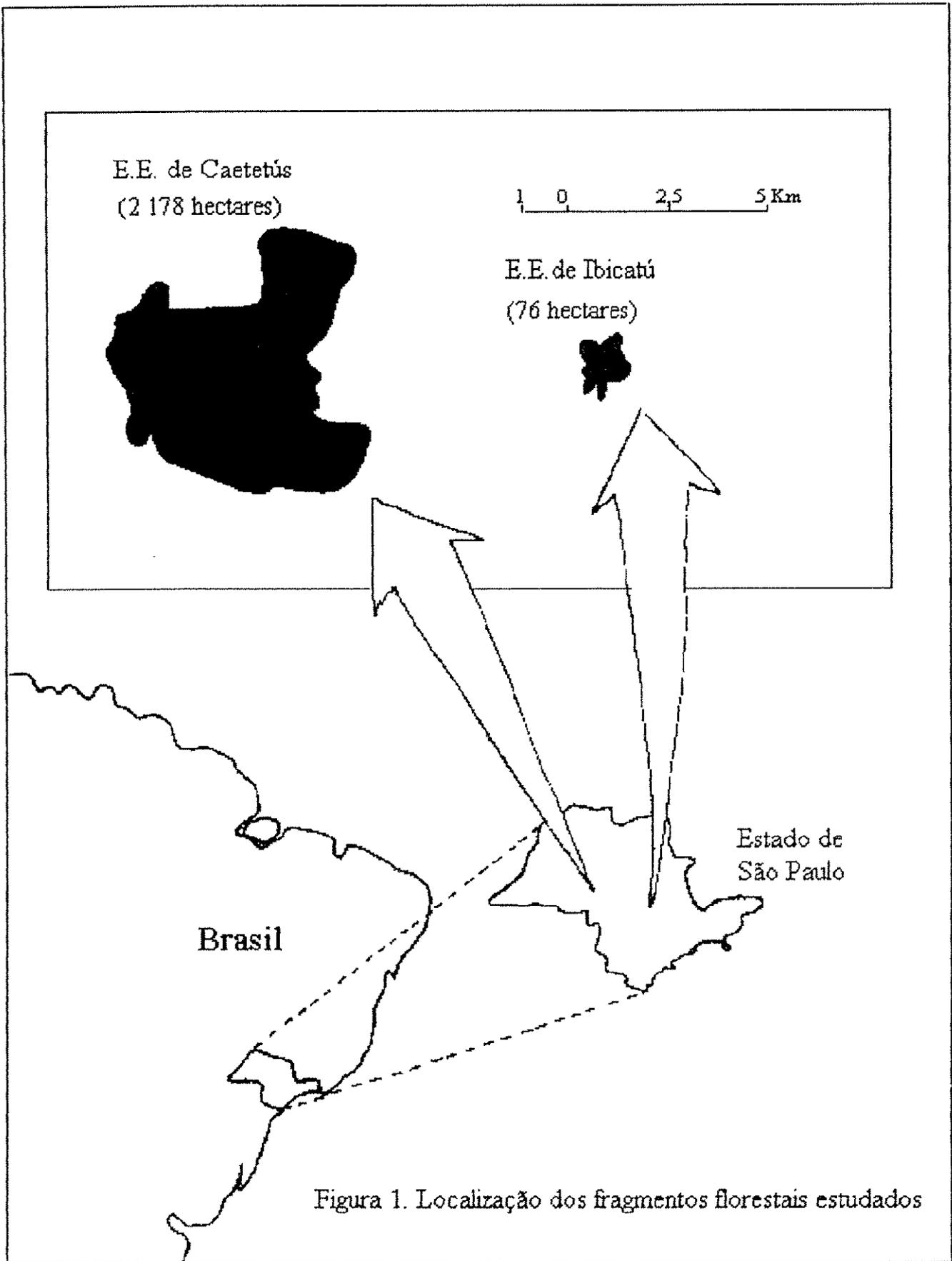


Figura 1. Localização dos fragmentos florestais estudados

4.2. Métodos

4.2.1. Amostragem no Campo

O material analisado consistiu de:

1. Oitenta indivíduos adultos de *E. leiocarpa*, sendo vinte de cada uma das quatro subpopulações amostradas (Subpopulações C1 e C2 da E.E. de Caetetés e subpopulações I1 e I2 da E.E. de Ibicatú). Em cada subpopulação foram analisados os vinte indivíduos mais próximos do indivíduo situado no centro da subpopulação,

2. Progênies constituídas de vinte plântulas oriundas de frutos de vinte árvores matrizes, sendo dez das árvores matrizes da subpopulação C2 da E.E. de Caetetés e dez da subpopulação I1 da E.E. de Ibicatú.

Cada um dos frutos coletados em campo foi colocado individualmente em saco de papel devidamente identificado por progênie. Os frutos foram expostos ao sol, para secagem, em caixas de madeira durante quarenta dias, no pátio do Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, sendo depois cada lote de semente colocado no viveiro do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP separadamente em caixas de plástico com terra adubada. Quarenta e cinco dias depois, quando as plântulas atingiram 5 a 7 centímetros de altura, procedeu-se a repicagem para laminado plástico de 30 plântulas por progênie, excetuando algumas progênies que não alcançavam este número de plântulas, quando então foram repicadas todas as plântulas disponíveis. As mudas foram mantidas cobertas com sombrite a 50 %. Depois de sessenta dias da repicagem iniciou-se o método de eletroforese de alozimas.

Coletou-se folhas em todas as plantas adultas marcadas no campo. Esta folhas foram embaladas em sacos plásticos, identificados com o número da árvore de origem, acondicionadas em caixas de isopor, contendo gelo, e transportadas para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), do Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP, em Piracicaba, e então armazenadas em geladeira a 5° C.

4.2.2. Amostras para Eletroforese de Alozimas

A eletroforese de alozimas para caracterização genética da espécie foi realizada no LARGEA, segundo a metodologia proposta por KEPHART (1990) e ALFENAS *et al.* (1991). Para esta caracterização, utilizou-se tecidos foliares de plântulas de progênies e de indivíduos adultos. A coleta dos tecidos foliares das plântulas foi feita preferencialmente no período da manhã e imediatamente submetidas à maceração, evitando assim a perda da atividade enzimática do material. Posteriormente, as amostras foram embaladas em endorfs e armazenadas em freezer a - 5° C. O tecido foliar dos indivíduos adultos era macerado e imediatamente submetido a eletroforese.

4.2.3. Extração das Enzimas

A rotina de extração das enzimas empregava aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, macerado com auxílio de um bastão de vidro, em placas de porcelana, sobre barras de gelo, com adição de aproximadamente 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polyvinyl Pirrolidone (PVP 40), 7 mg de Polyvinyl Pirrolidone (PVP-360) e 200 microlitros de solução de extração número 1 de ALFENAS *et al.* (1991, p. 41), modificada pela ausência de 2-Mercaptoetanol. Esta solução de extração é a mais comumente usada nos protocolos desenvolvidos no LARGEA. A solução extraída individualmente para cada planta (adultos e progênies) era absorvida em pedaços de papel de filtro (Whatman n° 3), nas dimensões de 6 x 10 mm ("Wicks") e posteriormente submetidas ao processo de eletroforese. Cada gel acondicionava amostras de vinte indivíduos, sendo nas duas extremidades adicionados "wicks" embebidos em solução de azul de bromofenol a 0,1%, objetivando marcar a distância máxima possível de migração das alozimas durante a "corrida".

4.2.4. Procedimentos de Eletroforese

A eletroforese de alozimas foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30), à 13%. A dimensão do gel usado era de 25 cm de comprimento, 15cm de largura e 2cm de altura. As "corridas" foram realizadas em geladeira com temperatura de 5° C. Sobre os géis eram adicionados placas de vidro e cubas de gelo, visando reduzir o aquecimento causado pela dissipação da energia elétrica. Nos primeiros trinta minutos de "corrida", mantinha-se a corrente elétrica constante a 35 mA, sendo após elevado a 40 mA, até o final do processo. A voltagem nos eletrodos foi de 120 a 180 volts e no gel de 6 a 8 volts nos primeiros trinta minutos e 140 a 210 volts e 8 a 10 volts, nos eletrodos e no gel, respectivamente, no restante do tempo de "corrida".

Os "wicks" contendo as amostras eram retirados dos géis, após trinta minutos de migração, sendo o tempo médio do processo de "corrida" de aproximadamente sete horas. Neste ponto, o marcador de azul de bromofenol atingia de 8 a 9 cm de migração. Terminada as corridas, os géis eram cortados em seis fatias, de espessura em torno de 1,0 mm, conforme ALFENAS *et al.* (1991, pag. 116), sendo a primeira fatia descartada. Quatro das faces restantes eram submetidas a coloração em enzimas específicas. As duas primeiras fatias se mostraram mais adequadas para os sistemas enzimáticos PGI, PRX e EST e assim foram utilizadas para estes sistemas.

4.2.5. Procedimento de Coloração dos Géis

Para obtenção dos sistemas enzimáticos SKDH, PGM, 6PGDH, PGI, IDH e MDH, diluí-se todos os reagentes (substratos, cofatores, catalisadores e outros) no tampão de coloração específico do sistema enzimático e então essa solução é adicionada ao gel, acondicionado em cuba de porcelana e imediatamente incubado no escuro, por vinte a quarenta minutos, em estufa a 37° C, até o aparecimento das bandas.

Alfa-esterase (α -EST) era preparada em duas soluções: solução A e B. A solução A era obtida pela diluição do substrato em acetona a 50%, sendo após adicionado a 40 ml de tampão de coloração. Após esta solução era despejada sobre o gel e este incubado no escuro em estufa a 37° C. A solução B era obtida pela diluição do Fast Garnet GBC Salt em n-propanol adicionada a 40 ml do tampão de coloração. Após vinte minutos adicionava-se a solução B ao gel imerso na solução A e as bandas apareciam em um intervalo de um a dois minutos.

Para obtenção da peroxidase (PRX), diluía-se o substrato no tampão de coloração, adicionava-se estes ao gel e depois pipitava-se 2 ml de água oxigenada a 3%. As bandas apareciam em um intervalo de um a dois minutos.

No Anexo I lista-se o protocolo para a revelação dos sistemas alozimáticos de *E. leiocarpa*.

Posteriormente à revelação, os géis eram secados e fotografados. Os géis foram interpretados logo após a revelação das alozimas, o que sem dúvida é a melhor forma de obtenção dos resultados, visto que a interpretação direta dos zimogramas é menos sujeita a erros.

A distância do marcador de bromofenol era medida no momento em que os géis eram cortados, afim de obter-se, como colocam ALFENAS *et al.* (1991), os valores de R_f . A estimativa da migração relativa (R_M) foi realizada conforme CHELIAK & PITTEL (1984).

A distinção dos locos aparentes foi a mesma definida por REIS (1996): em que cada região do zimograma que apresente um comportamento aparentemente independente dos demais e que possa ser interpretado geneticamente, ou que apresente uma segregação mendeliana aparente, definiu-se como loco. Ainda, o autor afirma que a coerência entre genitor feminino (receptor de pólen) e progênie proporciona a devida consistência a essa forma de interpretação.

Para numeração dos locos e alelos neste estudo, os sistemas enzimáticos com revelação de mais de um loco, denominou-se alfa-numericamente de forma crescente, dos locos mais catódicos para os mais anódicos, usando-se o mesmo procedimento para os alelos dentro dos locos, portanto, identificados pela sua migração relativa (R_f).

4.2.6. Estrutura Genética

A estrutura genética corresponde à distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. A forma como ela se distribui em populações de uma espécie é determinada por fatores ecológicos e genéticos. Os fatores genéticos são determinados pelo sistema reprodutivo (dioécia, monoécia, hermafroditismo, reprodução assexuada e apomixia), e pela forma de acasalamento (alogamia, autogamia e sistema misto e mecanismos de auto-incompatibilidade). Os principais fatores ecológicos envolvidos são a síndrome de dispersão de pólen e sementes, os quais determinam em parte a distribuição espacial e geográfica.

A estrutura genética das populações e subpopulações foi caracterizada pela análise das frequências alélicas, pelo teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e pelas estimativas das estatísticas F_s de Wright (WRIGHT 1965).

O EHW é baseado em premissas de acasalamentos aleatórios, ausência de mutação, migração, deriva genética, seleção e tamanho infinito das populações (FUTUYMA, 1992). Assim comparou-se os genótipos alozimáticos observados com os esperados pelos pressupostos do modelo. Para os locos que rejeitaram a hipótese nula de aderência ao EHW, fizeram-se testes χ^2 para verificação de aderência ao Equilíbrio de Endogamia Neutro de Wright (EENW), feito pela confrontação do número de genótipos observados com os esperados pelas expectativas do modelo.

As estatísticas F_s de Wright forneceram a proporção da diversidade contida entre as subpopulações (F_{SST}) e as populações (F_{ST}), os níveis de fixação alélica para as subpopulações (F_{SIS}) e populações (F_{IS}) e o total das populações (F_{STT}) e da espécie (F_{IT}). Foi utilizada esta metodologia, dado ser a mais utilizada nos trabalhos sobre estrutura genética de populações naturais. Estas estimativas foram obtidas empregando-se o programa BIOSYS-1 (SWOFFORD & SELANDER, 1989).

O F_{IS} corresponde à probabilidade de dois indivíduos tomados ao acaso de uma população serem idênticos por descendência. F_{IT} é a probabilidade que dois indivíduos tomados ao acaso no conjunto das populações serem idênticos por descendência. Valores positivos de F_{IS} e F_{IT} indicam déficit de heterozigotos e valores negativos, o oposto. Para verificar se F_{IS} e F_{IT} eram diferentes de zero, a nível de loco, usou-se o teste de qui-quadrado (χ^2), proposto por LI & HORVITZ (1953).

O F_{ST} mede a probabilidade que dois indivíduos tomados ao acaso em duas populações distintas sejam idênticos por descendência. Já para verificar a significância de F_{ST} utilizou-se o teste χ^2 , proposto por WORKMAN & NISWANDER (1970). Para testar se as médias de F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} eram diferentes de zero, usou-se o teste z , de acordo com LOISELLE *et al.* (1995).

4.2.7. Fluxo Gênico

O fluxo gênico foi estimado entre subpopulações do fragmento maior (E.E. de Caetetús) e do fragmento menor (E.E. de Ibicatú) e entre estas duas populações, de forma indireta, utilizando-se a fórmula proposta por CROW & AOKI (1984), $N_m = [1/(4\alpha F_{ST})] - 1$; onde N_m é o número de migrantes por geração, $\alpha = [n(n-1)]^2$ e n é o número de subpopulações ou populações e F_{ST} é a divergência genética entre subpopulações ou populações. Tais fórmulas baseiam-se no modelo de ilhas. As estimativas do tamanho de vizinhança foram realizadas baseadas no modelo de alpondras de estrutura populacional (SLATKIN & BARTON, 1989). O modelo de ilhas corresponde a migração aleatória entre grupos de pequenas populações e o modelo de alpondras (“stepping-stone”) pressupõe que cada população recebe migrantes somente das populações vizinhas (FUTUYMA, 1992).

Através da estimativa de N_m foi possível calcular o tamanho de vizinhança (N_b) ou número médio de indivíduos reprodutivos por área para que não ocorra depressão endogâmica por deriva genética nas unidades amostrais. Esta estimativa foi obtida de acordo com SLATKIN & BARTON (1989): $N_b = 2\pi N_m$.

Por sua vez, a partir da estimativa de N_b foi possível calcular a área média de vizinhança (A) conforme estimativas apresentadas por BOSHIER *et al.* (1995): $A = N_b/d$, onde d é o número de indivíduos reprodutivos por unidade de área, sendo d uma estimativa baseada no tamanho total da E.E. de Caetetús, na estimativa do número de subpopulações (reboleiras) encontradas na E.E. de Caetetús e na estimativa de indivíduos reprodutivos por subpopulação.

4.2.8. Variabilidade Genética Intrapopulacional

A variabilidade genética foi calculada a partir das estimativas das frequências alélicas de cada subpopulação de adultos e população de progênes. As frequências alélicas descrevem a variação para um loco (TORGGLER *et al.*, 1994). Estas frequências permitiram os cálculos dos índices de diversidade genética: a heterozigozidade média observada (H_o), heterozigozidade esperada (H_e) segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, a porcentagem de locos polimórficos (P), o número médio de alelos por loco (A) e o índice de fixação alélica de Wright (1965). Estes parâmetros foram obtidos a partir do programa BIOSYS-1 de SWOFFORD & SELANDER (1989).

A heterozigozidade média esperada para cada loco (H_e) foi obtida a partir das frequências alélicas, segundo expectativas de equilíbrio de Hardy-Weinberg de acordo com NEI (1987). A diversidade gênica ou heterozigozidade esperada conforme NEI (1973), equivale à quantidade de heterozigotos esperados em uma população de cruzamentos ao acaso (panmítica). É considerada a medida mais apropriada de diversidade gênica.

A heterozigozidade observada é calculada diretamente da amostra a partir das frequências genotípicas, podendo ser estimada para um ou mais locos. Para obter-se a heterozigozidade média observada (H_o), somou-se os valores obtidos para cada loco e dividiu-se pelo número total de locos (monomórficos mais polimórficos). A porcentagem de locos polimórficos (P) avalia o grau de polimorfismo encontrado na amostra (FUTUYMA, 1992) e foi obtida pela média aritmética do número total de alelos pelo número de locos. Considerou-se como um loco polimórfico, o loco em que a frequência do alelo mais comum não ultrapasse 95%.

O número médio de alelos por loco (A) é uma estatística que enfatiza a riqueza alélica. Representa uma quantidade definida e espera-se ser grande quando a amplitude do polimorfismo for grande. Possui forte dependência do tamanho amostral (NEI, 1987). O número médio de alelos por loco (A) foi obtido pela média aritmética do número total de alelos dividido pelo número total de locos. O índice de fixação alélica (f) pode ser considerado como uma medida do grau de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações, possibilitando a verificação da ocorrência de excessos de homozigotos ou perda de heterozigotos na população e podendo indicar o possível sistema de cruzamento da espécie. Este índice permite acessar os níveis de fixações alélicas por loco e a nível de média de locos, informando sobre o grau de endogamia dentro das populações. O f também pode ser usado para testar desvios das frequências genotípicas uniloco, das expectativas de Hardy-Weinberg (MURAWSKI & BAWA, 1994), devido aos acasalamentos em tal situação ocorrerem de forma aleatória; portanto, em populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg não existe endogamia, e o valor de f é igual a zero. Foi realizado o teste de qui-quadrado para verificar se o valor de f era estatisticamente diferente de zero, a nível de loco, conforme LI & HORVITZ (1953) e SEBBENN (1997). Para a média entre os locos, usou-se o teste z , a um intervalo de confiança de 95 de probabilidade (LOISELLE *et al.*, 1995).

4.2.9. Taxa de cruzamento

As estimativas das taxas de cruzamento uniloco e multiloco foram realizadas a partir do modelo proposto por RITLAND & JAIN (1981), empregando-se o programa MLTR (RITLAND, 1996), baseado no modelo de acasalamento misto de CLEGG (1980) e RITLAND & JAIN (1981), estimando-se, assim, a taxa de cruzamento multiloco, uniloco e a taxa de cruzamento entre aparentados.

O programa MLTR (RITLAND, 1996) não faz o teste χ^2 para a adequação dos dados às expectativas do modelo de acasalamento de RITLAND & JAIN (1981), dado que, muitas vezes locos altamente polimórficos apresentam desvios do modelo. Casos em que a matriz é homozigota para um determinado loco e a prole é altamente heterozigota, ou o inverso, podem levar a desvios significativos do modelo. O modelo é baseado em algumas pressuposições, sendo que, segundo REIS (1996), a violação da pressuposição da homogeneidade nas frequências alélicas dos óvulos e do pólen é a maior causa dos desvios do modelo, resultando em erros nas estimativas de cruzamento.

O programa permite estimar t_s e t_m para a população e para as famílias e para as frequências alélicas do óvulo e do pólen, pelo método Newton-Raphson e de máxima verossimilhança. Para estimar o erro padrão das estimativas de cruzamento uniloco e multiloco para a população, o programa utilizou o método “bootstrap”, onde a unidade de amostragem são as plantas dentro das famílias. Utilizou-se 100 reamostragens dentro das famílias, baseado em RITLAND (1996).

Para as estimativas multiloco foram utilizadas apenas seis das dez famílias estudadas por população, dado que as outras não apresentaram convergência nos cálculos (quando a taxa de cruzamento, a nível de famílias, resulta em valor igual a dois, significa que a taxa de cruzamento pode ser tanto 0 quanto 1).

Para verificar a homogeneidade das frequências alélicas do pólen e do óvulo, que é um dos pressupostos básicos do modelo de RITLAND & JAIN (1981) e segundo REIS (1996), é o maior responsável pelas estimativas tendenciosas de cruzamento, comparou-se estas frequências através da estimativa de F_{ST} de Wright para cada loco. As estimativas de F_{ST} para locos com três alelos, foram feitas a partir de VENCOVSKY (1993). Para testar a significância de F_{ST} para cada loco, aplicou-se o χ^2 (WORKMAN & NISWANDER, 1970).

4.2.10. Distribuição Espacial dos Genótipos

Com o intuito de analisar a estrutura genética espacial das subpopulações, procedeu-se a análise espacial dos genótipos através da autocorrelação, baseado em SOKAL & ODEN (1978a, b). O programa utilizado foi o “Autocorr”, confeccionado por John S. Heywood. (HEYWOOD, 1978). Vale ressaltar que não foi feito censo da subpopulação, mas sim uma amostragem não aleatória.

A autocorrelação foi feita para os locos polimórficos detectados nos indivíduos adultos, visando acessar a existência de estruturação familiar, ou verificar se os genótipos apresentam distribuição aleatória ou estruturada. Neste último caso, as árvores que estão próximas podem ser mais semelhantes ou aparentadas ou completamente diferentes (SOKAL & ODEN, 1978). A análise de autocorrelação considera cada alelo (π_i) como uma variável, assim, cada genótipo homocigoto recebe o valor de $\pi_i = 1,0$, o heterocigoto $\pi_i = 0,5$, e quando o alelo está ausente $\pi_i = 0,0$. O número de alelos analisados por loco corresponde a $n - 1$, onde: n é o número de alelos; portanto, em um loco com dois alelos apenas um foi avaliado, já que o outro tem frequência dependente deste.

A caracterização da estrutura espacial foi feita a partir do índice I de Moran, de acordo com SOKAL & ODEN (1978a). Foram utilizados intervalos de 3 metros de distância. Assim, quando o desvio padrão exceder 1,96 e 2,58, I será significativo a um nível de 95 e 99% de probabilidade, respectivamente.

O índice I de Moran pode assumir valor entre -1 e +1, sendo que -1 significa que os indivíduos pareados são completamente diferentes (autocorrelação negativa). O valor +1 significa que os indivíduos pareados são idênticos (autocorrelação positiva). Valor zero significa ausência de autocorrelação, isto é, os indivíduos estão aleatoriamente distribuídos no espaço.

O método de comparações dentro de classes de distâncias preestabelecidas, para a análise da distribuição espacial dos genótipos da *E. leiocarpa*, compara todos os pares de indivíduos. Aquelas comparações que apresentem uma distância entre si dentro de um intervalo preestabelecido recebem peso 1, e as demais comparações recebem valor zero. O número de classes de distâncias variou entre as subpopulações, objetivando um número de pares em torno de 30 em cada classe de distância. Para facilitar o entendimento do comportamento da distribuição espacial dos genótipos por classes de distância, construíram-se gráficos (correlogramas).

5. RESULTADOS

5.1. Estrutura Genética

Dos onze locos avaliados, Pgm-1, Idh-1 e Mdh-2 foram monomórficos e Skdh-1, 6Pgdh-2, Mdh-1, Mdh-3, Mdh-4, Est-1, Prx-1 e Pgi-2 foram polimórficos (figura 2). No fragmento maior (E.E. de Caetetús), os adultos amostrados apresentaram um total de 18 alelos e as progênies de 23; já no fragmento menor (E.E. de Ibicatu), foram detectados 19 alelos nos adultos e 22 nas progênies (tabela 1).

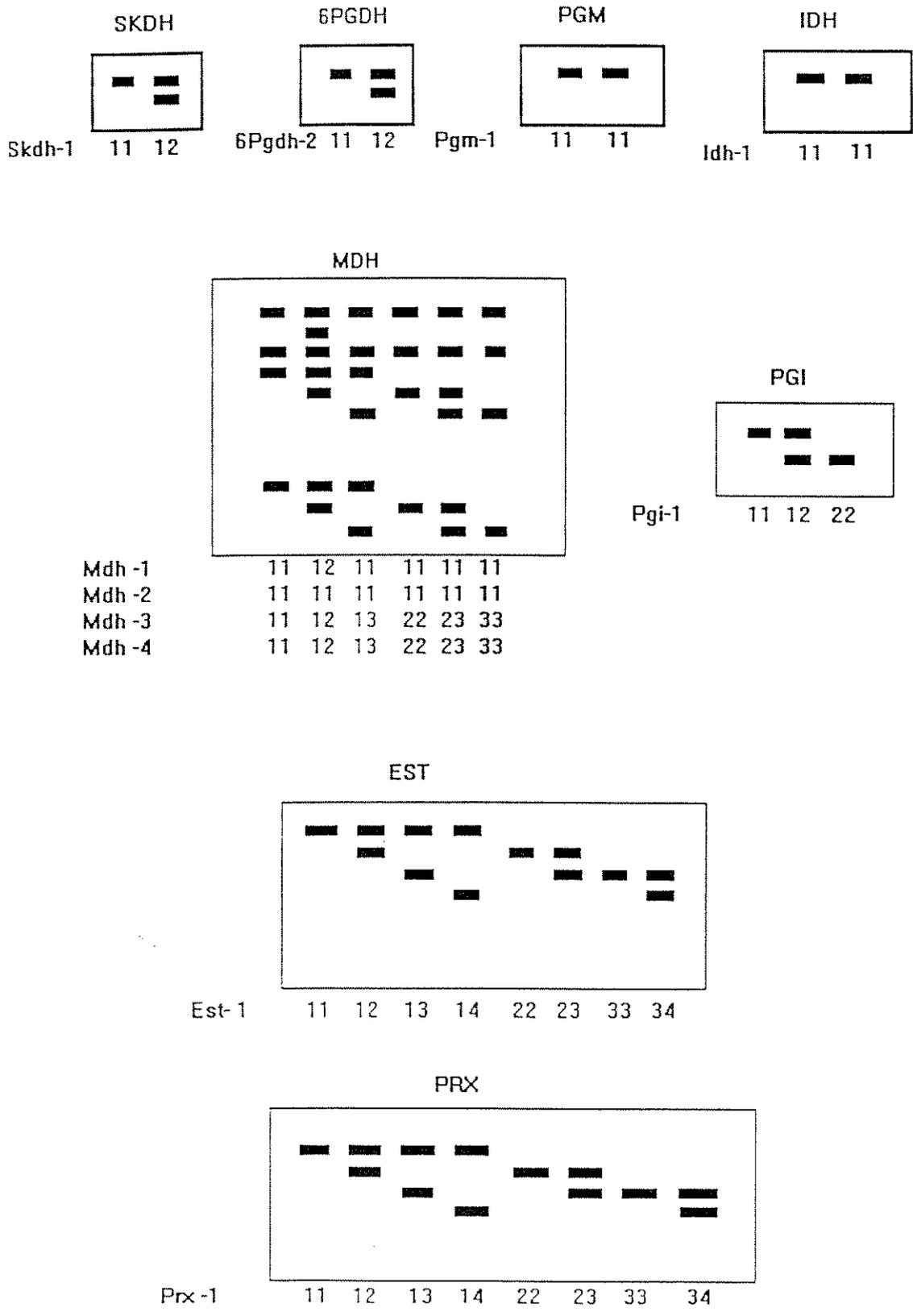


Figura 2. Esquema dos zimogramas dos padrões eletroforéticos oriundos de duas populações naturais de *E. leiocarpa*, para 11 locos e 8 sistemas isoenzimáticos

Tabela 1. Freqüências alélicas, tamanho da amostra (N) e número total de alelos (TA) nas populações e subpopulações de adultos e nas populações de progênies de *E. leiocarpa*, para 11 locos isoenzimáticos.

Loco	Alelo	Adultos						Progênies	
		E.E. de Caetetés (fragmento maior)			E.E. de Ibicatú (fragmento menor)			E.E. de Caetetés	E.E. de Ibicatú
		Pop.	Subp. 1	Subp. 2	Pop.	Subp.1	Subp. 2		
Pgm - 1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	N	45	26	19	43	23	20	190	180
6Pgdh-2	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,992	1,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000
	N	45	26	19	43	23	20	190	200
ldh - 1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	N	45	26	19	43	23	20	190	180
Skdh-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998	0,998
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002
	N	45	26	19	43	23	20	190	200
Mdh-1	1	1,000	1,000	1,000	0,977	0,950	1,000	1,000	0,993
	2	0,000	0,000	0,000	0,023	0,050	0,000	0,000	0,007
	N	45	26	19	43	23	20	140	140
Mdh - 2	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	N	45	26	19	43	23	20	120	140
Mdh-3	1	0,852	1,000	0,639	0,869	0,870	0,868	0,686	0,938
	2	0,148	0,000	0,361	0,131	0,130	0,132	0,292	0,062
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000
	N	44	26	18	42	23	19	118	89
Mdh - 4	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,988	0,969
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,022
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,009
	N	33	26	7	43	23	20	165	160
Pgi - 2	1	0,578	0,577	0,579	0,675	0,595	0,763	0,744	0,719
	2	0,422	0,423	0,421	0,325	0,405	0,237	0,256	0,281
	N	32	13	19	40	21	19	158	183
Est- 1	1	0,118	0,167	0,059	0,500	0,548	0,450	0,069	0,381
	2	0,632	0,714	0,529	0,134	0,119	0,150	0,566	0,211
	3	0,250	0,119	0,412	0,366	0,333	0,400	0,362	0,408
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000
	N	38	21	17	41	21	20	145	168
Prx - 1	1	0,500	0,519	0,472	0,256	0,283	0,225	0,121	0,224
	2	0,318	0,308	0,333	0,372	0,304	0,450	0,500	0,323
	3	0,170	0,154	0,194	0,360	0,413	0,300	0,379	0,450
	4	0,011	0,019	0,000	0,012	0,000	0,025	0,000	0,003
	N	44	26	18	43	23	20	29	181
TA		18	17	17	19	18	18	23	22

A comparação entre os resultados para as duas subpopulações de adultos do fragmento maior (E.E. de Caetetús), a comparação entre os resultados para as duas subpopulações do fragmento menor (E.E. de Ibicatú) e a comparação entre os resultados para as populações dos dois fragmentos, tanto de adultos quanto de progênies, mostraram poucas diferenças (Tabela 1):

Entre as subpopulações do fragmento maior (E.E. de Caetetús):

- Mdh-3: o alelo 1 esteve fixado na subpopulação 1, ocorrendo o alelo 2 na subpopulação 2.
- Prx-1: ocorreu o alelo 4 na subpopulação 1, estando o mesmo ausente na subpopulação 2.
- Est-1: o alelo 2 foi em ambas as subpopulações o mais freqüente, sendo o alelo 3 muito mais freqüente na subpopulação 2.

Entre as subpopulações do fragmento menor (E.E. de Ibicatú):

- Mdh-1: o alelo 2 ocorre na subpopulação 1 e é ausente na subpopulação 2.
- Prx-1: o alelo 4 ocorre na subpopulação 2 e está ausente na subpopulação 1, havendo também uma inversão de freqüência entre os alelos 2 e 3 como o mais freqüente.

Entre as populações de adultos dos dois fragmentos:

- Mdh-1: o alelo 1 esteve fixado no fragmento maior, ocorrendo o alelo 2 em baixa freqüência no fragmento menor.
- Est-1: o alelo 2 foi o mais freqüente no fragmento maior, enquanto que no fragmento menor o alelo 1 foi o mais freqüente.
- Prx-1: o alelo 1 foi o mais freqüente no fragmento maior e o alelo 2 foi o mais freqüente no fragmento menor.

Entre as populações de progênies dos dois fragmentos:

- 6Pgdh-2: o fragmento maior apresentou exclusivamente o alelo 2.
- Mdh-3: o fragmento maior apresentou exclusivamente o alelo 3.
- Mdh-4: o fragmento maior apresentou exclusivamente o alelo 3.
- Est-1: o fragmento maior apresentou exclusivamente o alelo 4. Há inversão de frequência alélica.
- Mdh-1: o fragmento menor apresentou exclusivamente o alelo 2.
- Prx-1: o fragmento menor apresentou exclusivamente o alelo 4. Há inversão de frequência alélica.

A comparação entre os resultados para adultos e para progênies no fragmento maior (E.E. de Caetetús) demonstrou que houve uma maior fixação de alelos nos adultos amostrados (Tabela 1):

- 6Pgdh-2 e Skdh-1: alelo 1 fixado.
- Mdh-4: Alelo 1 fixado nos adultos, ocorrendo os alelos 2 e 3 nas progênies.
- Prx-1: Inversão de alelo mais freqüente, sendo o mais freqüente nos adultos o alelo 1 e nas progênies o alelo 2. Oos adultos apresentaram o alelo 4 , ausente nas progênies.
- Mdh-3 e Est-1: alelos exclusivos nas progênies: alelo 3 e alelo 4, respectivamente.

Houve uma menor diferença na frequência e fixação de alelos na comparação entre os resultados para os adultos e progênies do fragmento menor (E..E.de Ibicatu) , em relação aos do fragmento maior (E.E. de Caetetús) (Tabela1):

- Skdh-1: alelo 1 fixado nos adultos, ocorrendo o alelo 2 nas progênies.
- Mdh-4: alelo 1 fixado nos adultos, ocorrendo os alelos 2 e 3 nas progênies.
- Prx-1: alelo 4 nas progênies, ausente nos adultos.

Equilíbrio de Hardy - Weinberg e Equilíbrio de Endogamia Neutro de Wright

A subpopulação 1 de indivíduos adultos do fragmento maior (E.E. de Caetetús) apresentou desvios do modelo de EHW em dois dos três locos avaliados (Tabela 2). Já a subpopulação 2 apresentou aderência de suas frequências alélicas em todos os locos às proporções de EHW. As progênies do fragmento maior (E.E. de Caetetús) apresentaram desvios do EHW em apenas um dos seis locos avaliados. As subpopulações de indivíduos adultos do fragmento menor (E.E. de Ibicatú) apresentou adequação ao EHW em quase todos os locos, com exceção do loco Mdh-1 na subpopulação 2 (Tabela 3). As progênies apresentaram desvios em três dos seis locos avaliados.

Os locos que apresentaram desvios do EHW e possuíam no mínimo três alelos foram submetidos ao teste de EENW (Tabela 4 e 5), visando separar desvios causados pelos efeitos do sistema reprodutivo (cruzamentos preferenciais, entre aparentados) dos causados por fatores evolucionários, como deriva genética e/ou seleção. O loco Est-1, na subpopulação 1 de adultos do fragmento maior (E.E. de Caetetús) e o loco Mdh-4 nas progênies do fragmento menor (E.E. de Ibicatú) mostraram desvios do modelo de EENW, sugerindo a atuação de algum efeito evolucionário. Já o loco Prx-1, na subpopulação 1 de adultos do fragmento maior (E.E. de Caetetús) e o loco Est-1 nas progênies do fragmento menor (E.E. de Ibicatú) apresentaram aderência ao modelo EENW, indicando que os desvios foram causados pelo sistema reprodutivo.

Tabela 2 - Teste de qui-quadrado (χ^2) não agrupado (^a), agrupado (^b) e de Fischer (^c) para o equilíbrio de Hardy-Weinberg para adultos e progênies no fragmento maior (E.E. de Caetetús).

Adultos - Subpopulação 1				
Loco	Classe	n_o	n_e	χ^2
Pgi - 2	1-1	5	4,327	0,133 ns
	1-2	5	6,346	1
	2-2	3	2,327	0,716 ^a
Est - 1	1	13	10,174	4,092 *
	2	4	8,571	1
	3	4	1,714	0,043 ^b
Prx - 1	1	3	7,010	8,162 **
	2	21	12,981	1
	3	2	6,010	0,004 ^b
Adultos - Subpopulação 2				
Mdh - 3	1-1	6	7,347	0,983 ns
	1-2	11	8,306	1
	2-2	1	2,347	0,321 ^a
Pgi - 2	1-1	8	6,368	1,405 ns
	1-2	6	9,263	1
	2-2	5	3,368	0,236 ^a
Est - 1	1	3	4,765	1,844 ns
	2	12	8,471	1
	3	2	3,765	0,174 ^b
Prx - 1	1	2	4,014	2,415 ns
	2	13	8,972	1
	3	3	5,014	0,120 ^b
Progênies - População				
Pgi - 2	1-1	98	87,381	18,173 **
	1-2	39	60,237	1
	2-2	21	10,381	0,000 ^a
Mdh - 3	1	56	55,602	0,002 ns
	2	50	50,797	1
	3	12	11,602	0,967 ^b
Est - 1	1	49	46,372	0,580 ns
	2	66	71,255	1
	3	30	27,372	0,466 ^b
Prx - 1	1	8	7,250	0,086 ns
	2	13	14,500	1
	3	8	7,250	0,769 ^b
6Pgdh - 2	1-1	187	187,012	0,000 ns
	1-2	3	2,976	1
	2-2	0	0,012	1,000 ^c
Mdh - 4	1	161	161,024	0,000 ns
	2	4	3,952	1
	3	0	0,024	1,000 ^b

Quando o n_o e o n_e contêm genótipos em todas as classes (ex. 1-1, 1-2, 2-2), o valor de χ^2 é o não agrupado; já quando em alguma classe o valor de n_o e n_e é menor que 1, os genótipos estão agrupados nas seguintes classes: 1- número de homocigotos para o alelo mais comum; 2- número de heterocigotos entre o alelo mais comum e os alelos mais raros; 3- número de homocigotos raros e outros heterocigotos.

Tabela 3 - Teste de qui- quadrado (χ^2) não agrupado ^(a), agrupado ^(b) e de Fischer ^(c) para o equilíbrio de Hardy-Weinberg para adultos e progênies no fragmento menor (E.E. de Ibicatú).

Adultos - Subpopulação 1				
Loco	Classe	n _o	n _e	χ^2
Pgi -2	1-1	7	7,440	0,014 ns
	1-2	11	10,119	1
	2-2	3	3,440	0,905 ^a
Prx -1	1-1	4	1,837	3,203 ns
	1-2	2	3,957	3
	1-3	3	5,370	0,361 ^a
	2-2	2	2,130	
	2-3	8	5,783	
	3-3	4	3,924	
Est -1	1	5	6,298	0,671 ns
	2	13	10,405	1
	3	3	4,298	0,413 ^b
Mdh -3	1-1	17	17,391	0,413 ^b ns
	1-2	36	5,217	
	2-2	0	0,391	1,000 ^c
Adultos - Subpopulação 2				
Pgi - 2	1-1	13	11,066	3,768 ns
	1-2	3	6,868	1
	2-2	3	1,066	0,052 ^a
Est - 1	1	3	4,050	0,383 ns
	2	12	9,900	1
	3	5	6,050	0,536 ^b
Prx - 1	1	3	4,050	0,383 ns
	2	12	9,900	1
	3	5	6,050	0,536 ^b
Mdh - 1	1-1	19	18,050	5,093 *
	1-2	0	1,900	1
	2-2	1	0,050	0,026 ^c
Mdh-3	1-1	14	14,329	0,006 ns
	1-2	5	4,342	1
	2-2	0	0,329	1,000 ^c
Progênies - População				
Pgi - 2	1-1	104	94,493	11,087 **
	1-2	55	74,014	1
	2-2	24	14,493	0,001 ^a
Est -1	1-1	14	24,381	15,252 **
	1-2	34	27,048	3
	1-3	66	52,190	0,002 ^a
	2-2	2	7,501	
	2-3	33	28,949	
	3-3	19	27,930	
Prx -1	1	4	3,924	2,190 ns
	2	11	11,152	1
	3	8	7,924	1,000 ^b
Skdh - 1	1-1	199	199,001	0,000 ns
	1-2	1	0,998	1
	2-2	0	0,001	1,000 ^c
Mdh - 1	1-1	139	138,007	0,003 ns
	1-2	0	1,986	1
	2-2	1	0,007	0,955 ^c
Mdh - 4	1	154	150,156	76,963 **
	2	2	9,688	1
	3	4	0,156	0,000 ^b

Quando o n_o e o n_e contêm genótipos em todas as classes, o valor de χ^2 é o não agrupado; já quando em alguma classe o valor de n_o e n_e é menor que 1, os genótipos estão agrupados nas seguintes classes: 1- número de homozigotos para o alelo mais comum; 2- número de heterozigotos entre o alelo mais comum e os alelos mais raros; 3- número de homozigotos raros e outros heterozigotos.

Tabela 4- Teste de χ^2 para aderência ao Equilíbrio de Endogamia Neutro de Wright (EENW). Subpopulação 1 de adultos- E.E. de Caetetés (fragmento maior). Graus de liberdade entre parenteses.

Loco		Est -1		loco		Prx - 1	
Classes	n _o	n _e	Classes	n _o	n _e	Classes	n _e
1-1	2	1,6392	1-1	3	4,9116	1-1	3
1-2	1	3,1900	1-2	13	11,2023	1-2	13
2-2	13	12,2657	1-3	7	5,2277	1-3	7
1-3	2	0,5317	1-4	1	0,7468	1-4	1
2-3	3	2,2786	2-2	1	0,2392	2-2	1
3-3	0	1,0949	2-3	0	2,9043	2-3	0
χ^2		7,01 * (5)	2-4	0	0,4149	2-4	0
			3-3	0	0,000	3-3	0
			3-4	0	0,1936	3-4	0
			4-4	0	0,0000	4-4	0
			χ^2		7,65 ns (5)		

Tabela 5- Teste de χ^2 para aderência ao Equilíbrio de Endogamia Neutro de Wright (EENW). População de progênies- E.E. de Ibicatú (fragmento menor). Graus de liberdade entre parenteses.

Loco		Mdh-4		loco		Est-1	
Classes	n _o	n _e	Classes	n _o	n _e	Classes	n _e
1-1	154	152,5152	1-1	14	15,3082	1-1	14
1-2	2	3,4788	1-2	34	33,2415	1-2	34
2-2	1	1,7438	2-2	2	1,0898	2-2	2
1-3	0	1,4909	1-3	66	64,1421	1-3	66
2-3	3	0,0337	2-3	33	35,5788	2-3	33
3-3	0	0,7377	3-3	19	18,6395	3-3	19
χ^2		264,56 ** (2)	χ^2		1,14 ns (2)		

Estatísticas F_s de Wright

Nos adultos de ambos os fragmentos, os níveis de fixação alélica dentro de populações (F_{IS}), foram negativos para quase todos os locos e para a média, exceção para o loco Pgi-1, o qual apresentou valor positivo e alto; porém, nem um destes valores foi estatisticamente diferente de zero (Tabela 6).

O índice de fixação alélica para as populações como um todo (F_{IT}), apresentou valores mais discrepantes quanto ao excesso ou deficiência de heterozigotos ou homozigotos. O loco Pgi-1 apresentou um valor significativo de excesso de homozigotos muito parecido com o apresentado pelo F_{IS} . O loco Est-1 apresentou excesso de homozigotos. Apesar das diferenças observadas entre locos para o F_{IS} e F_{ST} , a média mostra baixa endogamia nas populações, sugerindo que os desvios encontrados no teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg devem-se mais à fatores evolucionários, como seleção favorável à algum tipo de genótipo ou à deriva genética. As estimativas da divergência genética média entre populações (F_{ST}), foi de 6,4% (Tabela 6), mostrando que a variabilidade genética da espécie é mantida principalmente pela variabilidade que existe dentro das populações.

Quanto a estrutura genética entre subpopulações da mesma população, para o fragmento maior (E.E. de Caetetús), o F_{SIS} para a média dos locos apresentou excesso de heterozigotos, sendo que a média de F_{SIT} mostra que este excesso é de grandeza diferente nas subpopulações. O F_{SST} foi de 5,1%, indicando pequenas diferenças entre as subpopulações de fragmento maior (E.E. de Caetetús), e que a variabilidade genética da população é mantida pela variabilidade dentro de subpopulações. No fragmento menor (E.E. de Ibicatu) o F_{SIS} e F_{SIT} mostram um valor mais semelhante, indicando maior homogeneidade nos níveis de fixação alélicas das subpopulações. Este resultado é confirmado pela baixa, porém, significativa diferenças entres subpopulações ($F_{SST} = 1,4\%$).

A análise da estrutura genética entre populações a partir das progênes (Tabela 7), no geral, mostrou resultados muito semelhantes aos encontrados para os adultos, porém, com um pequeno e não significativo excesso de homozigotos.

Tabela 6. Estatística F de Wright para duas populações naturais de indivíduos adultos de *E. leiocarpa* (E.E. de Caetetés- fragmento maior e E.E. de Ibicatú- fragmento menor) e para o desdobramento dentro de populações (entre subpopulações). ns – Não significativo, * - Significativo a, ** - Significativo a .

	Subpopulações – fragmento maior (E.E. de Caetetés)			Subpopulações – fragmento menor (E.E. de Ibicatú)			Populações (E.E. de Caetetés e E.E. de Ibicatú)		
	F _{SIS}	F _{SIT}	F _{SST}	F _{SIS}	F _{SIT}	F _{SST}	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
Mdh-3	-0,324 ns	-0,033 ns	0,220 **	-0,151 ns	-0,151 ns	0,000 ns	-0,068 ns	-0,067 ns	0,001 ns
Pgi-1	0,282 ns	0,282 ns	0,000 ns	0,192 ns	0,218 ns	0,032 ns	0,251 ns	0,259 *	0,010 ns
Est-1	-0,056 ns	0,009 ns	0,062 ns	-0,147 ns	-0,139 ns	0,006 ns	-0,054 ns	0,108 ns	0,153 **
Prx-1	-0,399 ns	-0,397 **	0,002 ns	0,0037 ns	0,050 ns	0,014 ns	-0,160 ns	-0,117 ns	0,037 ns
Média	-0,116 ns	-0,059 ns	0,051 ns	0,016 ns	0,030 ns	0,014 *	-0,005 ns	0,059 ns	0,064 **

Tabela 7. Estimativas de F_{IS}, F_{IT} e F_{ST} para duas populações naturais de progênes de *E. leiocarpa*, (E.E. de Caetetés- fragmento maior e E.E. de Ibicatú- fragmento menor) baseadas em sete locos alozimáticos.

Loco	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
6pgdh-2	-0,008 ns	-0,004 ns	0,004 ns
Skdh-1	-0,003 ns	-0,001 ns	0,001 ns
Mdh -3	-0,040 ns	0,058 ns	0,095 **
Mdh - 4	0,347 **	0,349 **	0,003 ns
Pgi - 1	0,303 **	0,304 **	0,001 ns
Est - 1	-0,131 ns	-0,033 ns	0,086 **
Prx - 1	0,070 ns	0,087 ns	0,019 **
Média	0,049 ns	0,094 ns	0,048 **

5.2. Estimativa de Fluxo Gênico (N_m)

A estimativa do fluxo gênico (N_m) entre subpopulações e populações, tanto para adultos como para progênes, variou muito entre locos, com uma média de 1,16 indivíduos por geração entre as subpopulações de adultos do fragmento maior (E.E. de Caetetés), 4,40 entre as subpopulações de adultos do fragmento menor (E.E. de Ibicatú) e 0,91 (adultos) e 1,24 (progênes) entre as duas populações, mostrando uma intensa troca alélica por pólen e sementes entre subpopulações, em especial na população do fragmento menor (E.E. de Ibicatú), e por pólen entre as progênes das populações (N_m > 1) e baixa entre os adultos das populações (N_m < 1) (tabelas 8 e 9).

Assim como as estimativas de N_m , as estimativas do tamanho de vizinhança (N_b) e área de vizinhança (A), variaram muito entre as subpopulações e populações. O N_b médio foi de 7,31 indivíduos reprodutivos por hectare para as subpopulações do fragmento maior (E.E. de Caetetús), 27,66 para as subpopulações do fragmento menor (E.E. de Ibicatú) e 5,74 e 7,79 para as duas populações de adultos e progênies, respectivamente.

Tabela 8. Estimativa do fluxo gênico (N_m), tamanho de vizinhança (N_b) e área de vizinhança (A) entre subpopulações, dentro de populações de indivíduos adultos de *E. leiocarpa*.

	Entre Subps. da E.E. de Caetetús			Entre Subps. Da E.E. de Ibicatú		
	N_m	N_b	A ¹	N_m	N_b	A ¹
Mdh-3	0,22	1,39	0,33	2,34	14,71	3,35
Pgi-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Est-1	0,95	5,94	1,43	1,89	11,88	2,85
Prx-1	31,19	195,96	47,03	10,35	65,06	15,61
Média	1,16	7,31	1,75	4,40	27,66	6,64

¹: Considerando-se que a densidade média de indivíduos reprodutivos por hectare é de 4.

Tabela 9. Estimativa do fluxo gênico (N_m), tamanho de vizinhança (N_b) e área de vizinhança (A) entre duas populações naturais de indivíduos adultos e progênies de *E. leiocarpa*.

	Adultos			Progênies		
	N_m	N_b	A	N_m	N_b	A
6Pgdh-2	-	-	-	15,56	97,78	23,47
Skdh-1	-	-	-	62,44	392,31	94,15
Mdh-3	62,44	392,31	94,15	0,60	3,74	0,90
Pgi-1	6,19	38,88	9,33	62,44	392,31	94,15
Est-1	0,35	2,17	0,52	0,66	4,17	1,00
Prx-1	1,63	10,22	2,45	3,23	20,28	4,87
Média	0,91	5,74	1,38	1,24	7,79	1,87

5.3. Diversidade Genética Intrapopulacional

Os valores encontrados para a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) nas duas subpopulações de ambos os fragmentos, bem como entre populações, não foram significativamente diferentes entre si, a julgar pelos valores do erro padrão da média (Tabela 10). No fragmento maior (E.E. de Caetetús) estes valores foram de 0,138 para H_o e 0,141 para H_e na subpopulação 1 e 0,235 para H_o e 0,193 para H_e na subpopulação 2, levando a valores médios na população iguais a 0,178 para H_o e 0,171 para H_e . No fragmento menor (E.E. de Ibicatú), estes valores foram de 0,188 e 0,176 para H_o e H_e nas subpopulação 1, 0,161 e 0,178 para H_o e H_e na subpopulação 2 e 0,175 e 0,180 para H_o e H_e para a população. Comparando-se os resultados obtidos para as progênies do fragmento maior (E.E. de Caetetús) com a subpopulação de adultos, observa-se poucas variações para H_o e H_e . Este resultado foi igual para o fragmento menor (E.E. de Ibicatú) (Tabela 10).

Os locos segregaram de 1 a 4 alelos, sendo que o número médio de alelos por loco (A), para os adultos, foi de 1,64 na população do fragmento maior (E.E. de Caetetús) e 1,73 na população do fragmento menor (E.E. de Ibicatú). As progênies de ambas as populações apresentaram A igual a 2,00 (Tabela 10).

As populações adultas e as progênies amostradas tiveram porcentagem de locos polimórficos (P, com 95% de probabilidade) de 36,36%, com valores indo de 27,27% a 45,45% para as progênies (Tabela 10).

O índice de fixação alélica médio (f) foi muito próximo a zero em quase todas as unidades amostrais, exceção para a subpopulação 2 do fragmento maior (E.E. de Caetetús) (-0,218). Entretanto, este valor, igualmente como os demais, não foi significativamente diferente de zero (Tabela 10).

Tabela 10. Índices de diversidade intrapopulacionais nas populações, subpopulações de adultos e populações de progênies de *E. leiocarpa* e os correspondentes desvios padrões da média, entre parênteses. ns – Não significativo.

	População fragmento maior (E.E. de Caetetús)				População fragmento menor (E.E. de Ibicatú)			
	Adultos			Progênies	Adultos			Progênies
	Subp.1	Subp.2	Pop.		Subp.1	Subp.2	Pop.	
H_o	0,138 (0,082)	0,235 (0,106)	0,178 (0,087)	0,183 (0,076)	0,188 (0,084)	0,161 (0,081)	0,175 (0,081)	0,172 (0,079)
H_e	0,141 (0,074)	0,193 (0,082)	0,171 (0,076)	0,182 (0,075)	0,176 (0,080)	0,178 (0,077)	0,180 (0,079)	0,170 (0,079)
A	1,55 (0,31)	1,55 (0,25)	1,64 (0,31)	2,00 (0,33)	1,55 (0,25)	1,73 (0,30)	1,73 (0,30)	2,00 (0,30)
P	27,27	36,36	36,36	36,36	36,36	45,45	36,36	36,36
f	0,021 ns	-0,218 ns	-0,041 ns	-0,028 ns	-0,068 ns	0,096 ns	0,028 ns	-0,012 ns

5.4. Taxa de cruzamento

No fragmento maior (E.E. Caetetús), dos sete locos analisados, apenas três (Mdh-4, Est-1 e Prx-1), apresentaram desvios significativos (5%) do modelo, o que corresponde a 57,1% dos locos aderidos ao modelo (Tabela 11). No fragmento menor (E.E. de Ibicatú), dos seis locos analisados, apenas 1 (Pgi-1) apresentou desvios significativos (1%), o que por sua vez, corresponde a 83,3% dos locos em concordância com o modelo (Tabela 12). Entretanto, apesar da significancia estatística detectada em alguns locos, as estimativas de divergência genética em todos os locos foram muito baixas, variando no fragmento menor (E.E. de Ibicatú) de 0,1% (Mdh-3) a 3,8% (Mdh-4) e no fragmento maior (E.E. de Caetetús) de 1,0% (Est-1) a 6,8% (Pgi-1). Assim, pela baixa magnitude de F_{ST} em todos os locos e pelo percentual de locos por população adequados ao modelo de acasalamento misto, pode-se esperar estimativas de cruzamento pouco viesadas.

A família número 6 da população do fragmento maior (E.E. de Caetetés) foi a que apresentou menor taxa de cruzamento (29%), seguida da família 3 (59%) e família 5 (77%). Na população do fragmento menor (E.E. de Ibicatú), a família número 2 foi a que apresentou menor taxa de cruzamento (53%), seguida da família 5 (82%) e 1 (95%) (Tabela 13).

A taxa de cruzamento multiloco da população do fragmento maior (E.E. de Caetetés) foi de 0,991 e a da população do fragmento menor (E.E. de Ibicatú) de 1,080; a taxa de cruzamento uniloco foi de 0,940 para o fragmento maior (E.E. de Caetetés) e 1,127 para o fragmento menor (E.E. de Ibicatú) (Tabela 13). Contudo, considerando o erro padrão da média, medido pelo intervalo de confiança, a taxa de cruzamento multiloco e uniloco não foram diferentes de 1,0. Assim, observa-se que a espécie reproduz-se preferencialmente por fecundação cruzada. A diferença entre t_m e t_s foi de 0,051 para o fragmento maior (E.E. de Caetetés) e -0,047 para o fragmento menor (E.E. de Ibicatú), e a julgar pelo intervalo de confiança, não foi diferente de zero.

Tabela 11. Divergência genética entre frequências alélicas do óvulo e do pólen, contribuintes para o conjunto gênico das progênies de *E. leiocarpa* do fragmento maior (E.E. de Caetetés).

Loco	N	GL	Alelo	Pólen	Óvulos	F_{ST}	χ^2																																																														
6Pgdh-2	110	1	1	0,972	0,923	0,012	1,33 (ns)																																																														
			2	0,028	0,077			Mdh-3	110	1	1	0,991	0,917	0,031	3,43 (ns)	2	0,009	0,083	Mdh-4	85	2	1	0,953	0,857	0,020	3,41(ns)	2	0,036	0,071	3	0,011	0,072	Pgi-1	100	1	1	0,598	0,833	0,068	6,78 **	2	0,402	0,167	Est-1	91	3	1	0,100	0,071	0,010	2,80 (ns)	2	0,489	0,571	3	0,400	0,286	4	0,011	0,072	Prx-1	12	2	1	0,168	0,417	0,031	0,87 (ns)	2
Mdh-3	110	1	1	0,991	0,917	0,031	3,43 (ns)																																																														
			2	0,009	0,083			Mdh-4	85	2	1	0,953	0,857	0,020	3,41(ns)	2	0,036	0,071				3	0,011	0,072			Pgi-1	100	1	1	0,598	0,833	0,068	6,78 **	2	0,402	0,167	Est-1	91	3	1	0,100	0,071				0,010	2,80 (ns)	2			0,489	0,571	3	0,400	0,286	4	0,011	0,072	Prx-1				12	2	1			0,168
Mdh-4	85	2	1	0,953	0,857	0,020	3,41(ns)																																																														
			2	0,036	0,071																																																																
			3	0,011	0,072			Pgi-1	100	1	1	0,598	0,833	0,068	6,78 **	2	0,402	0,167	Est-1	91	3	1	0,100	0,071	0,010	2,80 (ns)	2	0,489	0,571	3	0,400	0,286	4	0,011	0,072	Prx-1	12				2	1	0,168	0,417	0,031	0,87 (ns)			2	0,414	0,250	3	0,418	0,333															
Pgi-1	100	1	1	0,598	0,833	0,068	6,78 **																																																														
			2	0,402	0,167			Est-1	91	3	1	0,100	0,071	0,010	2,80 (ns)	2	0,489	0,571				3	0,400	0,286			4	0,011	0,072	Prx-1	12	2	1	0,168	0,417			0,031	0,87 (ns)	2		0,414	0,250	3			0,418	0,333																					
Est-1	91	3	1	0,100	0,071	0,010	2,80 (ns)																																																														
			2	0,489	0,571																																																																
			3	0,400	0,286																																																																
			4	0,011	0,072			Prx-1	12	2	1	0,168	0,417	0,031	0,87 (ns)	2	0,414	0,250	3	0,418	0,333																																																
Prx-1	12	2	1	0,168	0,417	0,031	0,87 (ns)																																																														
			2	0,414	0,250																																																																
			3	0,418	0,333																																																																

Tabela 12. Divergência genética entre frequências alélicas do óvulo e do pólen, contribuintes para o conjunto gênico das progênies de *E. leiocarpa* do fragmento menor (E.E. de Ibicatú).

Loco	N	GL	Alelo	Pólen	Óvulo	F _{ST}	χ^2
Mdh-1	100	1	1	0,990	0,923	0,027	2,70 (ns)
			2	0,010	0,077		
Mdh-3	69	1	1	0,938	0,917	0,002	0,11 (ns)
			2	0,062	0,083		
Mdh-4	100	2	1	0,981	0,857	0,038	7,58 *
			2	0,010	0,071		
			3	0,009	0,072		
Pgi-1	114	1	1	0,693	0,750	0,004	0,46 (ns)
			2	0,307	0,250		
Est-1	116	2	1	0,313	0,500	0,028	6,60 *
			2	0,239	0,250		
			3	0,448	0,250		
Prx-1	111	2	1	0,213	0,083	0,031	7,00 *
			2	0,196	0,417		
			3	0,591	0,500		
Skdh-1	120	1	1	0,992	0,923	0,030	3,51 (ns)
			2	0,008	0,077		

Tabela 13. Estimativas da taxa de cruzamento por família, multiloco (t_m), uniloco (t_s), entre aparentados ($t_m - t_s$).

	Pop1 (Caetetés) ¹	Pop2 (Ibicatú)
Família 1	1,760 (0,420)	0,950 (0,500)
Família 2	1,670 (0,620)	0,530 (0,250)
Família 3	0,590 (0,570)	1,080 (0,440)
Família 4	1,650 (0,220)	1,090 (0,550)
Família 5	0,770 (0,400)	0,820 (0,310)
Família 6	0,290 (0,15)	1,470 (0,270)
t_m	0,991 (0,325)	1,080 (0,131)
t_s	0,940 (0,233)	1,127 (0,153)
$T_m - t_s$	0,051 (0,123)	-0,047 (0,047)

¹ Desvios padrões da média, entre parênteses.

5.5. Distribuição Espacial dos Genótipos

Os valores do índice I de Moran por classes de distância, para todos os alelos, nas quatro populações, oscilaram de positivos à negativos, fluando sempre em torno de 0 (Figura 3). Apenas alguns valores foram significativamente negativos.

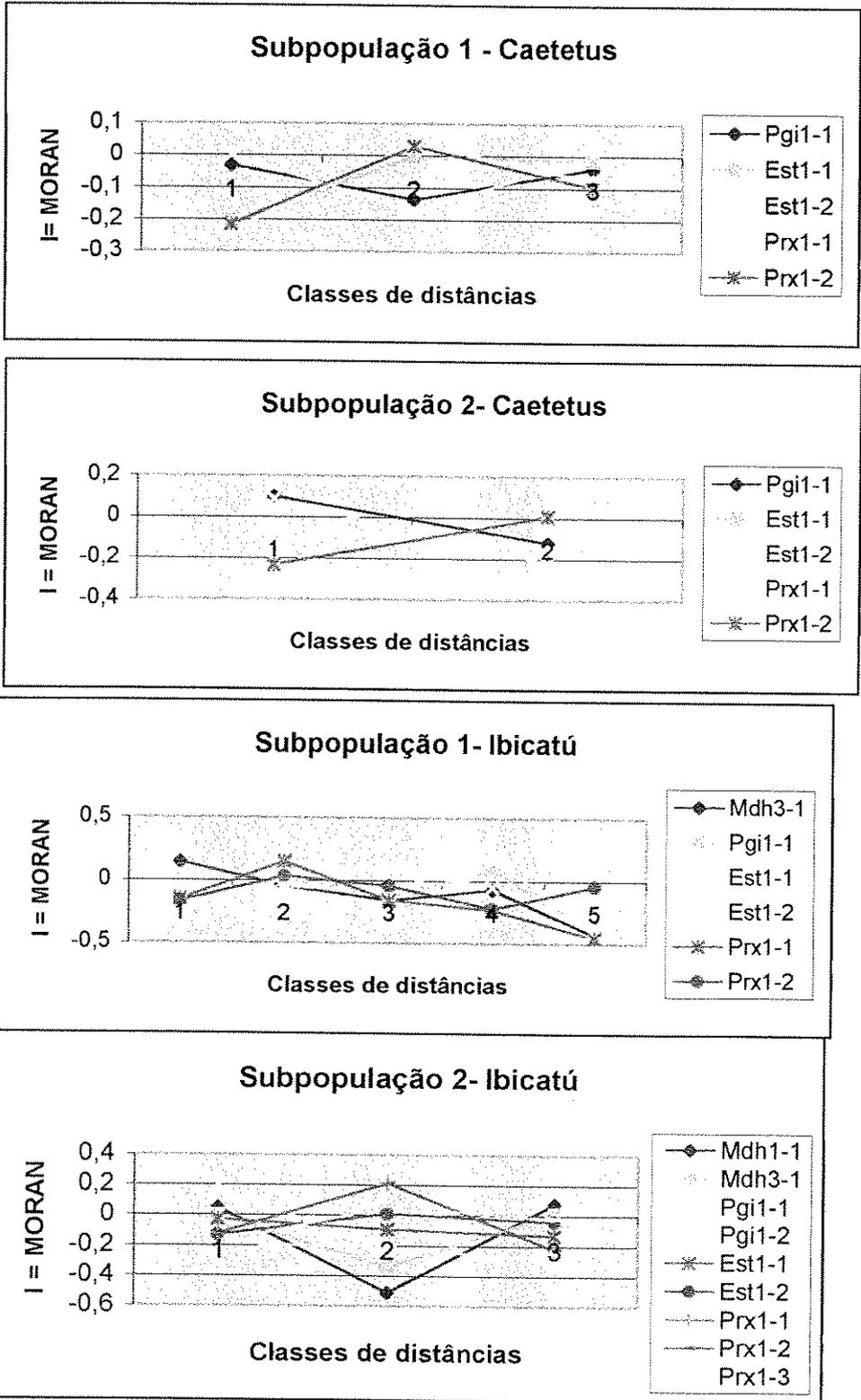


Figura 3 - Correlogramas para os valores do índice I de Moran

6. DISCUSSÃO

A comparação entre as frequências alélicas de adultos e progênies da população do fragmento maior demonstra maiores diferenças do que no fragmento menor (tabela1). A menor diferença entre as subpopulações do fragmento menor ($F_{SST} = 1,4\%$) em relação a diferença entre as subpopulações do fragmento maior ($F_{SST} = 5,1\%$) confirmam tal resultado (tabela2). O valor de $5,1\%$ para o F_{SST} do fragmento maior evidenciou que a variabilidade genética da população é mantida também pela variabilidade entre subpopulações.

Como o fragmento maior é constituído de mais subpopulações, deve haver um maior potencial para troca alélica, sendo que os alelos exclusivos na sua progênie podem ser oriundos, através do pólen, de outras subpopulações. Por sua vez, o fragmento menor tem menos subpopulações, havendo assim uma menor possibilidade de entrada de alelos, tendo ocorrido, portanto, uma menor troca alélica entre indivíduos diferentes, o que pode permitir ou aumentar a homogeneização da população. Além disso, as subpopulações amostradas no fragmento menor eram menos distantes entre si do que as subpopulações amostradas no fragmento maior, o que também pode ter influência nestes resultados. Estes resultados apontam para a importância, em termos de conservação genética da espécie, da preservação de áreas naturais que abriguem várias subpopulações da espécie.

Considerando que a amostragem avaliou duas gerações sucessivas, pode-se afirmar, de um modo geral, que a população do fragmento maior (E.E. de Caetetús) se encontra em EHW e que os acasalamentos ocorreram ao acaso, dado que a maioria dos locos em ambas as gerações estavam em EHW.

A subpopulação 2 encontrava-se com suas proporções genotípicas em EHW, dando origem à progênies igualmente em EHW, sugerindo acasalamentos aleatórios e, teoricamente, ausência de fatores evolucionários. A subpopulação 1 apresentou dois locos com desvios do EHW, sendo que um destes estava em EENW, evidenciando que seus desvios foram causados por acasalamentos entre aparentados ou preferenciais, as formas de endogamia que podem ocorrer na espécie, dado que a mesma é auto-incompatível. Os desvios observados no outro loco foram causados por deriva genética aleatória ou seleção natural. Contudo, considerando o caráter neutro das alozimas, estes desvios devem ser atribuídos à deriva genética.

Tais desvios podem ter ocorrido devido à estruturação da população em subpopulações, que mesmo em fora de EHW como unidade pode, no conjunto, formar um população em EHW, o que não pode ser testado com a amostragem de apenas duas subpopulações por população.

No fragmento menor (E.E. de Ibicatú), as duas subpopulações de adultos encontraram-se em aderência ao EHW. No entanto, as progênies, oriundas da subpopulação 1, apresentaram desvios do EHW em 50% dos locos avaliados, sendo este desvio causado, em um dos locos (Est-1), pelo sistema reprodutivo, dado que este estava em EENW; no loco Mdh-4, o desvio do EHW e do EENW foi teoricamente causado por fatores evolutivos, mais possivelmente por deriva genética aleatória, porém existindo a possibilidade de seleção a favor de heterozigotos entre a fase de plântula e a fase adulta, considerando que os desvios do EHW, nos locos Pgi-2 e Mdh-4, foram causados por excesso de homozigotos e os adultos que os geraram estavam em EHW.

No geral os resultados para as estatísticas F_s foram coerentes com a literatura para espécies arbóreas tropicais, que mostram maiores níveis de variabilidade genética dentro das populações do que entre populações.

A discrepância encontrada no resultado para os níveis de fixação alélica dentro de populações (F_{IS}) entre o valor positivo no loco Pgi-1 e os demais, com valores negativos, pode ser indicativo de seleção para homozigotos neste loco, que pode estar ligado a locos de expressão seletiva e não neutra. O excesso de homozigotos encontrado para o loco no índice de fixação alélica para as populações como um todo (F_{IT}) reforça a hipótese da não neutralidade para este loco.

Por sua vez, o loco Est-1 apresentou em F_{IT} um excesso de homozigotos, mostrando um comportamento genético diferenciado entre as populações para este loco, sugerindo deriva genética em uma das populações. As estimativas da divergência genética média entre populações (F_{ST}), apesar de baixas, foram estatisticamente significativas, indicando certas diferenças entre populações.

Os baixos valores de fixação alélica (F_{IS} e F_{IT}), para a média dos locos, para todos os níveis de amostragem (populações e subpopulações) de adultos e progênes e a conformação ao EHW para a maioria dos locos sugerem que a espécie adequa-se a um modelo panmítico. Este modelo, por sua vez, indica que a espécie é preferencialmente alógama, distribuindo seus genes aleatoriamente entre os indivíduos dentro e entre as subpopulações e populações. Quanto a maiores diferenças detectadas entre as populações (6,4%) do que dentro das populações (5,1% para Caetetús e 1,4% para Ibicatu), estas devem ter ocorrido devido a grande distância entre as populações, aproximadamente 200 km, o que restringe o fluxo gênico.

Os valores obtidos para as estimativas de N_m , N_b e A para as populações de adultos e progênes não foram discrepantes, facilitando a conclusão de que estes altos valores de N_m para as subpopulações indicam que o fluxo gênico é suficiente para prevenir a diferenciação por deriva genética. Contudo, as estimativas de N_m entre adultos das populações mostraram uma menor troca gênica, indicando a possibilidade de diferenciação entre as populações dos dois fragmentos por deriva genética.

O fluxo gênico foi maior entre as subpopulações dentro de populações do que entre as populações, o que era esperado, já que as subpopulações estão distanciadas algumas centenas de metros, enquanto as populações estão distantes cerca de 300 km. Tal distância e as barreiras geográficas como rios e montanhas entre as populações em conjunto com as características do polinizador, que não realiza vôos a tão longa distância, deve restringir a troca alélica. Soma-se a estas barreiras as agora impostas pelo uso antrópico, como microclimas desfavoráveis ao polinizador e a redução do número de subpopulações pela fragmentação. Estes fatores, em conjunto, possivelmente levará à divergência das populações por deriva genética.

Os valores encontrados para o tamanho de vizinhança (N_b) sugerem a necessidade diferenciada de indivíduos reprodutivos de cada população para a manutenção da variabilidade genética existente. No caso do fragmento menor, constituído de poucas subpopulações, estas apresentaram um maior tamanho efetivo necessário para garantir a manutenção de sua variabilidade genética. Por sua vez, a população de Caetetús, onde existe um número bem maior de subpopulações trocando genes, é necessário um menor tamanho efetivo para impedir efeitos de endogamia. Concordantemente, a área de vizinhança (A) foi maior na população menor. Contudo, tais resultados podem refletir a diferença de distância entre as subpopulações amostradas em cada um dos fragmentos.

A porcentagem de locos polimórficos encontrada para *E. leiocarpa* neste experimento foi menor que as encontradas para as outras espécies arbóreas da Mata Atlântica brasileira já estudadas através de alozimas, mostrando pouca variação entre locos (MORAES, 1993; GANDARA, 1996; REIS, 1996; MALTEZ, 1997; SEBBENN, 1997).

O número médio de alelos por loco mostrou uma maior riqueza alélica na amostra de adultos do fragmento menor (Ibicatú). Entretanto, ao julgar pelo erro padrão da média, esta diferença entre populações não é significativa. É interessante observar que nas progênies de ambas as populações detectou-se uma maior riqueza alélica relativamente aos indivíduos adultos. Este resultado deve decorrer de uma maior amostragem de indivíduos de progênies e da presença de fluxo gênico, com alelos advindos de outras populações, subpopulações e até possivelmente de adultos não amostrados das próprias subpopulações.

Os valores encontrados nas populações e subpopulações para a heterozigozidade média observada (H_o) quase sempre foram maiores que os da heterozigozidade média esperada (H_e), sugerindo um efeito de seleção em favor de heterozigotos. Porém tais valores para heterozigozidade observada e esperada são estatisticamente iguais, o que, aliado ao fato de que os índices de fixação alélica não foram significativamente diferentes de zero, indicam que as populações estão em EHW.

É importante notar que no fragmento maior existem maiores diferenças nas heterozigosidades entre subpopulações, devido possivelmente, a variabilidade genética da população ser distribuída pelo fluxo gênico em um número maior de subpopulações, como observado pelas estimativas de N_m . Novamente, tais fatores podem estar refletindo a diferença de distância entre subpopulações amostradas em cada fragmento.

A maior riqueza alélica, detectada nas progênies pelo número de alelos por locos, sugere a presença de fluxo gênico externo à população amostrada. Todos os valores de heterozigosidade (H_o e H_e) foram semelhantes e altos para as subpopulações e populações de adultos e progênies, relativamente à média dos estudos de HAMRICK et al. (1979) e HAMRICK & GODT (1990). Esta alta heterozigosidade é de valor relevante, dado ao grande número de novas recombinações genotípicas possíveis de ocorrer nas próximas gerações, capacitando a adaptação e colonização da espécie a novos ambientes, ou seja, é de grande valor para a evolução da espécie.

Apesar de todas as diferenças entre as duas espécies, é interessante haver uma comparação entre os índices de diversidade genética obtidos neste experimento com os obtidos para outra espécie climacica estudada do ponto de vista da genética de populações, *Euterpe edulis* (REIS, 1996). Nota-se que para *E. leiocarpa* todos estes valores foram muito menores que os de *E. edulis*, o que era esperado, já que *E. edulis* tem meios mais eficientes de polinização e dispersão de sementes.

Esperava-se um coeficiente de endogamia relativamente alto, principalmente ao nível de subpopulação, decorrente do efeito fundador. Porém, o índice de fixação foi baixo e não diferente de zero em todos os níveis de amostragem, reforçando os resultados das estatísticas F_s . O valor de $-0,218$, encontrado para o índice de fixação alélica (f) na subpopulação 2 de Caetetús pode ser um indicativo da presença de seleção favorecendo localmente os heterozigotos. Muitos estudos têm encontrado evidências semelhantes, podendo-se citar os trabalhos de MURAWSKI (1995), REIS (1996) e SEBBENN (1997).

Segundo RITLAND (1997), diferenças positivas entre t_m e t_s sugerem a presença de acasalamentos endogâmicos. De acordo com o resultado obtido para o fragmento maior, observa-se um certo grau de endogamia, advindo de cruzamentos entre aparentados (5,1%) e autofecundação (1%). Sendo *E. leiocarpa* é uma espécie autoincompatível, a autofecundação pode refletir problemas amostrais. Novamente considerando os intervalos de confiança para as estimativas de t_m , t_s e $t_m - t_s$ pode-se tomar estes problemas amostrais como sendo de pequena magnitude e portanto desprezíveis.

Os resultados para as taxa de cruzamento mostram que a maioria das famílias para as duas populações foram geradas exclusivamente por cruzamentos. LEPSH-CUNHA (1996), estudando *Couratari guianensis*, realizou um acompanhamento fenológico das matrizes antes de realizar a coleta de sementes para a análise genética da taxa de cruzamento, e observou que as matrizes que floresceram fora do pico de florada apresentaram menores taxas de cruzamento a nível de família. REIS (1996) e SEBBENN (1997) atribuíram para as taxas de cruzamento, a nível de família, menores do que 1, ao assincronismo entre a florada dos indivíduos que compunham a população, ou seja, estas plantas floresceram fora do pico da florada. No presente estudo, provavelmente as famílias com baixa taxa de cruzamento, em ambas as populações, são decorrentes também do assincronismo do florescimento. No entanto, esta hipótese não pode ser testada com os presentes dados, dado que não foi feito um acompanhamento fenológico das matrizes das populações.

A análise do evento reprodutivo de *E. leiocarpa*, mostrando altas taxas de cruzamento para ambas as populações, combinados com os resultados da estrutura genética, fluxo gênico intenso entre subpopulações e alta variabilidade intrapopulacional, permitem supor a não existência de estruturação espacial dos genótipos. A análise da distribuição espacial dos genótipos indicou que a distribuição dos genótipos é aleatória em todas as subpopulações, ou seja, as subpopulações não estão estruturadas na forma de famílias. Contudo, alguns valores foram negativos, podendo sim haver um mecanismo de autoincompatibilidade de indivíduos geneticamente parecidos.

Deve-se considerar que, nesta análise, os indivíduos que foram considerados não próximos não estão distantes entre si mais que 50 metros. A análise de distribuição espacial dos genótipos confirma as evidências encontradas nas demais análises deste trabalho, de que as subpopulações não estão estruturadas. Portanto derruba-se a hipótese da existência de estruturação.

Assim, a análise genética das populações de *E. leiocarpa* mostrou que a variabilidade genética encontra-se distribuída em vários níveis hierárquicos: dentro de populações e dentro de subpopulações dentro de populações. Porém, dentro das subpopulações, a variabilidade genética não se encontra de forma estruturada, sendo portanto, aleatoriamente distribuída. Este resultado derruba um dos pontos da hipótese postulada, que a variabilidade genética encontrava-se estruturada dentro das subpopulações, o que também foi confirmado pela baixa fixação alélica dentro das subpopulações. A análise da forma de acasalamento não revelou a produção de indivíduos por endogamia, mostrando um forte taxa de cruzamento nas populações e um modelo que sugere panmixia para a espécie.

Estes resultados são importantes para o planejamento das estratégias de conservação *in situ* da espécie, mostrando que a espécie, apesar de comum, não mantém sua variabilidade genética dentro de pequenas áreas, pois importante parte da variabilidade parece ser mantida pelo fluxo gênico aleatório, ocorrente entre o grande número de subpopulações que compõem a população, mantendo assim, diferenças entre subpopulações, como observado pelo F_{ST} (5,1%) para as subpopulações do fragmento grande (Caetetús), nitidamente maior do que o F_{ST} (1,4%) encontrado para o fragmento menor (Ibicatú), onde ocorre fluxo gênico sistemático.

Estes resultados apontam para a impossibilidade da conservação genética *in situ* da biodiversidade arbórea em pequenas áreas, indicando que mesmo para as espécies comuns é necessária a manutenção de grandes áreas em estado natural para a efetiva conservação genética *in situ*.

6. CONCLUSÕES

O estudo genético das populações de *E. leiocarpa* permitiu as seguintes conclusões:

1) A maior parte da variabilidade genética se encontra entre os indivíduos dentro das subpopulações;

2) A análise dos níveis de fixação alélica não mostrou endogamia, sendo que a reprodução da espécie aproxima-se de um modelo de panmixia;

3) A estimativa de fluxo gênico entre populações mostrou baixos valores, o que era esperado, devido às síndromes de polinização e dispersão de sementes da espécie e a distância entre os fragmentos. Porém, as estimativas do fluxo gênico entre subpopulações dentro de populações foram altas, mostrando troca intensa de material genético por pólen e sementes;

4) O estudo do sistema reprodutivo mostrou que a espécie reproduz-se por cruzamentos aleatórios,

5) A análise da distribuição espacial dos genótipos mostrou que a distribuição dos indivíduos nas subpopulações é aleatória;

6) Os dados obtidos sugerem que quanto menos subpopulações existirem em um fragmento, mais a população estará sujeita a perda de variabilidade genética, o que poderá comprometer a sobrevivência local da espécie, à longo prazo.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, R.W. Pelagic seabird community structure in the southern Benguela region (South Africa): changes in response to man's activities? **Biological Conservation** **32: 33-50**. 1985.
- ALFENAS, S.A.; PETERS, I.P.; BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. Eletroforese de Proteínas e Fungos em Essências Florestais. Viçosa, UFV, MG. 242 pag. 1991.
- ALLARD, R.W. Princípios do Melhoramento Genético das Plantas. Edgard Blucher Ltda. (Ed). 381 pag. 1971.
- BALLAL, S.R.; FORÉ, S.A. & GUITTMAN, S.I. Apparent gene flow and genetics structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. **Canadian Journal of Botany** **72: 1311-1315**. 1994.
- BANSE, G. & BEZZEL, E. Number of species and size of area in the breeding birds of Central Europe. **Journal Fuer Ornithologie** **125: 291-306**. 1984.
- BARRETT, S.C.H. & KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Genetics and conservation of rare plants. FALK, D.A. & HOLSINGER, K.E. (eds.) Center for plant conservation. Oxford University Press. 3-30. 1991.
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution** **28: 85-92**. 1973.
- BIERREGAARD, R.O. Jr. & LOVEJOY, T.E. Birds in Amazonian forest fragments: effects of insularization. **Acta XIX Congress Internationalis Ornithologici**. University of Ottawa Press, Ottawa, ON, Canada. 1988.
- BIERREGAARD, R.O. Jr & LOVEJOY, T.E. Effects of forest fragmentation on Amazonian understory bird communities. **Acta Amazônica** **19:215-241**. 1989.
- BILLINGTON, H.L. Effect of population size on genetic variation in a dioecious conifer. **Conservation biology** **5: 115-119**. 1991.
- BLEICH, V.C., WEHAUSEN, J.D. & HOLL, S.A. Desert-dwelling mountain sheep: conservation implications of a naturally fragmented distribution. **Conservation biology** **4(4): 383-390**. 1990.

- BOITANI, L. Genetic considerations on wolf conservation in Italy. **Bolletino di Zoologia** **51 (3-4): 367-374**. 1984.
- BOSHIER, D.H.; CHASE, M.R. & BAWA, K.S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Matyng system. **American Journal of Botany** **82 (4): 476-483**.1995.
- BRENNAN, E.J. De Brazza Monkeys (*Cercopithecus negectus*) in Kenia: Census, distribution and conservation. **American Journal of Primatology** **8 (4): 269-278**. 1985.
- BROWN, A.H.D. & WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: Tanksley, S.D. & Orton ,T.J. (eds.) Isozymes in plant genetics and breeding. Part ^a Amsterdam, Elsevier. 219-239. 1983.
- BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M.; APSIT, V.; PRANCE, G.T. & BAWA, K.S. Genetics of Brasil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. **Theoretical Applied Genetics** **76: 923-928**. 1988.
- CATARINO, L.M.E. Estudo fisionômico, florístico e fitossociologia em matas residuais no município de Piracicaba-SP. Mestrado. Unicamp, 1989. 181 p.
- CHARLESWORTH, D. & CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual Ecology and Systematics** 1987. 102 p.
- CHASE, M.R.; BOSHIER, D.H. & BAWA, K.S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1- Genetic variation in natural populations. **American Journal of Botany** **82 (4): 468-475**. 1995.
- CHELIAK, W.M. & PITEL, J.A. Techniques for starch gel eletrophoresis of enzymes from forest tree species. **Information report Pi -X Chalk River (42): 1-49**. 1984.
- CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience** **30 (12): 814-18**. 1980.
- CONRY, P.J. *Gaur Borsgaurus* and development in Malásia. **Biological Conservation** **49 (1): 47-66**. 1989.
- CORDER, M.R.M. & LOPES, C.R. Análise Genética de Padrões Isoenzimáticos de *Eucalyptus spp.* em Diferentes Estágios de Desenvolvimento. **Anais do 1º Congresso Florestal Panamericano e 7º Congresso Florestal Brasileiro. Curitiba - PR. (1): 82-84**. 1993.

- COSTA, L.G.S. Estrutura e dinâmica de trecho de mata mesófila semidecídua, na Estação Ecológica de Ibicatú, Piracicaba-SP. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, USP. 1992.
- CRESTANA, C.S.M.; DIAS, I.S. & KAGEYAMA, P.Y. Biologia floral do Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl). **Silvicultura** 28 (Anais do 4º Congresso Florestal Brasileiro): 35-38. 1982.
- CROW, J.F. & AOKI, K. Groupselection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 81, p. 6073-6077. 1984.
- DA-SILVA, J.M.C. The aspects of ecology and behavior of Formicivora *Grisea grisea* in Amazonian environments. **Revista Brasileira de Biologia** 48 (4). 797-806. 1988.
- DE-VIEDMA, M.G.; ESCRIBANO, R.; GOMEZ-BUSTILLO, M.R. & MATTONI, R.H.T. The 1st attempt to establish a nature reserve for the conservation of lepidoptera in Spain. **Biological Conservation** 32 (3): 255-276. 1985.
- DMOWSKI, K. & KOZAKIEWICZ, C.S. Influence of a shrub corridor on movements of passerine birds to a lake littoral zone. **Landscape Ecology** 4 (2-3): 99-108. 1990.
- DUCOUSSO, A.; PETIT, D.; VALERO M. & VERNET, P. Genetic variation between and within populations of a perennial grass: *Arrhenatherum elatius*. **Heredity** 65: 179-188. 1990.
- ELLSTRAND, N.C. & ELAN, D.R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. **Annual Review on Ecological Systematics** 24:217-242. 1993.
- FEARNSIDE, P.M. Deforestation and international economic development projects in Brazilian Amazonia. **Conservation Biology** 1: 214-221. 1987.
- FORÉ, S.A.; HICKEY, R.J.; VANKAT, J.L.; GUTTMAN, S. & SHAEFER, R. Genetic structure after forest fragmentation: an landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. **Canadian Journal of Botany** 70. 1659-68. 1992.
- FOSTER, B.R. & RAHS, E.Y. A study of canyon-dwelling mountain goats in relation to proposed hydroelectric development in Northwestern British Columbia, Canada. **Biological Conservation** 33(3): 209-228. 1985.

- FRANKIE, G. W.; VINSON, S. B.; NEWSTROM, L. E.; BARTHELL, J. F.; HABER, W. A. & FRANKIE, J. K. Plant phenology, pollination ecology, pollinator behaviour and conservation of pollinators in neotropical dry forest. In: Reproductive ecology of tropical forests plants. Bawa, K. S & Hadley, M. pags. 37-47. 1990. 319 p.
- FUTUYMA, D.J. Biologia evolutiva. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 631 p.
- GANDARA, F.B. Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Piracicaba, 1996, 96 p. (Mestrado - ESALQ/USP)
- GOMEZ-POMPA, A.; VAZQUEZ-YANES, S. & GUEVARA, S. The tropical rain forest : A nonrenewable resource. **Science** **177**: 762-765. 1972.
- GRANT, V. Gene Flow and the Homogeneity of Species Populations. **Biological Zbl.** 99:157-69, 1980.
- GUNATILLEKE, C.V.S. & GUNATILLEKE, I.A.U.N.. Phytosociology of Sinharaja : A contribution to rain forest conservation in Sri Lanka. **Biological Conservation** **31(1):21-40**. 1985.
- HALL, P.; WALKER, S. & BAWA, K.. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in tropical tree, *Pithecelobium elegans*. **Conservation Biology** 10 (3):757-768. 1996.
- HAMRICK, J.L. & GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. e Weir, B.S. (eds) **Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources**. Sinauer, Massachusetts, 1990. p.43-63.
- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. The influence of seed dispersal mechanism on the genetic structure of plant populations. In: Estrada, A. e Fleming, T.H. (ed.). **Frugivores and seed dispersal**. Dr. Junk Publications, Dordrecht, The Netherlands, pp.211-223. 1986.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A. & NASON, J.D. 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetation**, **107/108**:281-297.

- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B. & MITTON, B.C. Levels of Genetic Variation in Trees: Influence of Life History Characteristics. In: MT CONKLE (tech coord.) *Pranc. Symp. on Isoenzymes of North American Forest trees and Forest Insects. USDA For Service, Gen. Tech. Report PSW-48.* Barkley; pag. 35-41, 1979.
- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: association with reproductive biology. In: BOCK, JH & LINHART, YB (eds). **The Evolutionary Ecology of Plants.** Westview Press, USA. 129-146p, 1989. 319 p.
- HAMRICK, J.L. & MURAWSKI, D.A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, 7: pag. 395-399, 1991.
- HAMRICK, J.L. Gene Flow and Distribution of Genetic Variation in Plant Populations. In: *Differentiation Patterns in Higher Plants.* **Academic Press.** Pag. 53-67, 1987.
- HAMRICK, J.L. The Distribution of Genetic Variation Within and Among Natural Forest Population. In: SHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBIDE, B & THOMAS, W.L. ed. **Genetic and Conservation.** New York, The Benjamin/Cummings Publication co. pag. 335-48, 1983. 319 p.
- HEINEN, K. & MERRIAM, G. The elements of connectivity where corridor quality is variable. **Landscape Ecology**(2-3):157-170. 1990.
- HERMAN, J.T.; GUBBELS, R.; SCHEPERS, F. & SHOLS, R. : The importance of the streams in South Limburg (Netherlands) for wildlife. **Publ. Van Het Nat. Gen. Limburg 38 (1): 35-68.** 1990 .
- HEYWOOD, J.S. Spatial Analysis of Genetic Variation in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics 22:**335-55, 1991.
- HILL, R.J.; PRANCE, G.T.; MORI, S.A.; STEWARD, W.C.; SHIMABUKURU, D. & BERNARDI, J. Estudo Eletroforético da Dinâmica da Variação Genética entre Taxa Ribeirinhas ao Longo do Rio Solimões, América do Sul. **Acta Amazonica 8 (2):183-199.** 1978.
- HOWE, H.F. The implications of seed dispersal by animals for tropical reserve management. **Biological Conservation 30(3):261-282.** 1984
- HOWE, H. F. & SMALLWOOD, J. Ecology of seed dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics 13: 201-228.** 1982.

- JANZEN, D.H. An abandoned field is not a tree fall gap. **Vida Silvestre Tropical**, 2 (2):64-67. 1990.
- JOHNSINGH, A.J.T., PRASAD, S.N. & GOYAL, S.P. Conservation status of the Chilamotichur corridor for elephant movement in Rajaji-Corbett National Parks Area, India. **Biological conservation** 51(2):125-138. 1990.
- KAGEYAMA, P.Y. & GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: Implicações para o manejo e a conservação. III Simpósio de ecossistemas da costa brasileira. 1993. POR PAGINAS
- KAGEYAMA, P.Y. Conservação "In Situ" de Recursos Genéticos de Plantas. **Revista do IPEF**. Piracicaba. (35):7-37, 1987.
- KAPOS, V. Effects of isolation on the water status of forest patches in the Brazilian Amazon. **Journal of Tropical Ecology** 5: 173-185. 1989.
- KEPHART, S.R. Starch Gel Electrophoresis of Plant Isozymes: A Comparative Analysis of Techniques. **American Journal of Botany** 77(5):693-712. 1990
- LI, C.C. & HORVITZ, D.G. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **American Journal of Human Genetics** 5:107-117.1953.
- LAWRANCE, W.F. Comparative responses of five arboreal marsupials to tropical forest fragmentation. **Journal of mammalogy** 71(4) : 641-653. 1990.
- LEITÃO-FILHO, H.F. Consideração sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. **Revista do IPEF** (35), 41-46.1987.
- LEPCH-CUNHA, N. Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia Central. Piracicaba, 1996. 147 p. (Mestrado-ESALQ/USP).
- LOISELLE, B.A.; SORK, V.L., NASON, J. & GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** 82(11):1420-1425. 1995.
- LORENZ, G.C. & BARRETT, G.W. Influence of simulated landscape corridors on house mouse (*Mus musculus*) dispersal. **American Midland Naturalist** 123 (2) : 348-356.1990.

- LORENZI, H. Árvores Brasileira: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa, SP. Ed. **Plantarum**. 302 p., 1992.
- LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. Distribución de la Variación en Espécies de Arboles Tropicales. **Revista Biología Tropicales** **35**: 165-75, 1987.
- MacARTHUR, R.H. & WILSON, E.O. An equilibrium theory of insular zoogeography. **Evolution** **17**: 373 - 387.1963
- MacARTHUR, R.H. & WILSON, E.O.. The theory of islands biogeography. Princeton Press, Princeton.1967.
- MALTEZ, M.H. Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae (Peroba Rosa) em uma floresta estacional semidecidual noEstado de São Paulo. Piracicaba, ESALQ. 132p. 1997 (Tese de Mestrado).
- MANSERGH, I.M. & SCOTTS, D.J. Habitat continuity and social organization of the mountain pygmy-possum restored by tunnel. **Journal of Wildlife Management** **53(3)**:701-707.1989.
- MENGES, E.S. Population viability analysis for an endangered plant. **Conservation Biology** **4(1)**: 52-62. 1990.
- MENGES, E.S. & GAWLER, S.C. Four-year changes in population size of endemic Furbish's lousewort (*Pedicularis furbishiae*) : implications for endangerment and management. **Natural Areas Journal** **6(1)**: 6-17. 1986.
- MERRIAM, G. & LANOUE, A. Corridor use by small mammals: field measurement for three experimental types of *Peromyscus leucopus*. **Landscape Ecology** **4(2-3)**123-132.1990.
- MORAES, M.L.T. Variabilidade Genética por Isoenzimas e Caracteres Quantitativos em duas Populações Naturais de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão - **Anarcadiaceae** (Syn: *Astronium urundeuva* FR Allemão Engler). Piracicaba, ESALQ/USP. 153 p. 1993. (Tese de Doutorado).
- MORAN, G.F.; MUONA, O. & BELL, J.C. *Acacia Mangium*: A tropical forest tree of the coastal lowlands with low genetic diversity. **Evolution** **43 (1)**, 231-235. 1989.

- MURAWSKI, D.A. & BAWA, K.S. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **American Journal of Botany**, **81(2):155-160**. 1994.
- MYERS, N. Tropical forests: present status and future outlook. **Climatic Change** **19:3-32**. 1991
- NAKATSU, T.; JOHNS, T.; KUBO, I.; MILTON, K.; SAKAI, M.; CHATANI, K.; SAITO, K.; YAMAGIWA, Y. & KAMIKWWA, T. Isolation, structure and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from *Esenbeckia leiocarpa*. **Journal of Natural Products (Lloydia)** **53 (6)1508-1513**. 1990.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Procedures on Natural Academic Science USA**. **70(12):3321-3**. 1973.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press. 512 p., 1987.
- NEI, M. Molecular population genetics and evolution. In: NEUBERGER, A. & TATUM, E.L., eds., **Frontiers of Biology**. Elsevier, New York. 40, 1975.
- NEWMARK, W.D. Legal boundaries of western North American national parks: a problem of congruence. **Biological Conservation** **33(3): 197-208**. 1985.
- POLANS, N.O. & ALLARD, R.W. An experimental evaluation of recovery potential of ryegrass populations from genetic stress resulting from restriction of population size. **Evolution**, **43. 1320-1324**. 1989.
- PRICE, M.V. & LONGLAND, W.S. Use of artificial seed patches by heteromyid rodents. **Journal of mammalogy** **70(2):316-322**. 1989.
- RANKIN DE MERONA, J.M.; HUTCHINGS R.W. & LOVEJOY, T.E. Tree mortality and recruitment over a five year period in undisturbed upland rainforest of the Central Amazon. In Gentry, A.: **Four Neotropical Rainforests**, 573-584. Yale University Press, New Haven. 1990.
- REIS, M.S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em população naturais de palmitero (*Euterpes edulis* M.). Piracicaba, ESALQ/USP. 82 p. 1996. (Tese de Doutorado)
- RITLAND, K. & JAIN, S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, **47(1):35-52**.

- RITLAND, K. Multilocus mating system program - MLTR. Version 1.1 1996. (unpublished).
- SANTOS, P.S. Fragmentação de habitats : implicações para a conservação in situ. In: **Oecologia Brasiliensis**. Esteves, F. A. (Ed.). 616p.
- SAUNDERS, D. Problems of survival in a extensively cultivated landscape : the case of Carnaby's cockatoo *Calyptorhynchus funereus latirostris*. **Biological conservation** **54(3): 277-290**.1990.
- SEBBENN, A.M. Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas. Piracicaba/ESALQ. 107 p. 1997.(Tese de Mestrado).
- SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. Estação Ecológica de Caetetus. **Série Áreas Naturais, IPEF**,1987.
- SOKAL, R.R. & ODEN, N.L. Spatial Autocorrelation in Biology. I - Methodology. **Biological Journal of the Linnean Society** **10: 199-228**. 1978 a.
- SOKAL, R.R. & ODEN, N.L. Spatial Autocorrelation in Biology. II - Some Biological Implications and Four Applications of Evolutionary and Ecological Interest. **Biological Journal of the Linnean Society** **10: 229-49**.1978 b.
- SOUZA, L.M.F.I. Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St.Hill. (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) - Brasil. Tese de Mestrado. ESALQ. 76 p. 1997.
- SMART, N.; HATTON, J.C. & SPENCE, D.H.N. The effect of long term exclusion of large herbivores on vegetation In Murchison Falls National Park, Uganda. **Biological Conservation** **33(3):229-246**. 1985.
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B. 1989. **Biosys-1**. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. **Illinois Natural History Survey, Release 1,7**. Illinois.
- SZACKI, J. Ecological corridor as a factor determining the structure and organization of a bank vole population. **Acta Theriologica** **32 (1-10): 31-44**. 1987.
- TABACCHI, E.; PLANTY-TABACCHI, A.M. & DECAMPS, O. Continuity and discontinuity of the riparian vegetation along a fluvial corridor. **Landscape Ecology** **5(1):9-20**. 1990.

- TEMPLETON, A.R.; SHAW, K.; ROUTMAN, E. & DAVIS, S.K. The genetics consequences of habitat fragmentation. **Annual Missouri Botanical Garden** 77 : 13 -27. 1990.
- TERBORGH, J. The role of felid predators in neotropical forests. **Vida Silvestre Tropical** 2(2): 3-5. 1990.
- TIBIRIÇÁ, L.C. Dicionário de topônimos brasileiros de origem Tupi. Traço Editora. 1985.
- THOMAS, T.R. & IRBY, L.R. Habitat use and movements Patterns by migrating mule deer in southeastern Idaho (USA). **Northwest Science** 64(1) : 19-27.1990.
- TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. Série Monografias, 1. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 186 p.1994.
- VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Revista Brasileira de Genética**, 17 (3):349-51. 1994.
- VENCOVSKY, R. Estimadores de diversidade. In: KAGEYAMA, P.Y.; REIS, M.S.; GANDARA, F.B.: "Estimação de variação genética e taxa de cruzamento em populações arbóreas". ESALQ/USP Manuscrito não publicado, 82p. 1993.
- VIANA, V.M.; TABANEZ, A.J.A. & MARTINEZ, J.L.A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. In : Anais do 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas. p.400-406.1992.
- VIANA, V.M. Conservação da Biodiversidade de fragmentos de florestas tropicais em paisagens intensivamente cultivadas. In: Anais da Conferência Internacional: "on common ground: interdisciplinary approaches to biodiversity conservation and Land use dynamics in the new world". Belo Horizonte. Brasil. p. 135-154, 1995.
- WILCOVE, D.S. From fragmentation to extinction. **Natural Areas Journal** 7, 23-29.1987.
- WOOD, P.A. & SAMWAYS, M.J. Landscape element pattern and continuity of butterfly flight paths in an ecologically landscaped botanic Garden, Natal, South Africa. **Biological Conservation** 58 (2):149-166. 1991.

- WORKMAN, P. & NISWANDER, J.L. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. **American Journal Human Genetics** **22:24-49**. 1970.
- WRIGHT, J.A. Conservación "ex situ" de Espécies Nativas en Colombia. **Investigación Forestales: Informe de Investigación nº 159**. 5 p. 1993.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution** **19: 395-420**. 1965.
- WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist**, **56:330-338**. 1922.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics** **28: 114-138**. 1943.
- WEIR, B.S. Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. North Caroline State University, Sinauer Associates Inc. Pub., Suderland, Massachusetts. 377p. 1990.
- WRIGHT, S. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics** **31 : 39-59**. 1946.
- YOUNG, A; BOYLE, T. & BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tree** **11 (10)**. 413-418. 1996.

8 -ANEXOS

Anexo 1 - Protocolo para a revelação dos sistemas isoenzimáticos de *E. leiocarpa*

Tabela 14. Dados das corridas eletroforéticas realizadas com limbos foliares de *E. leiocarpa*.

V inicial no gel	10V
V inicial na fonte	120 a 170V
V final no gel	18 a 32V
V final máxima na fonte	200 a 350V
I inicial	25 a 40 mA
I final	25 a 40 mA
Tempo de corrida	6 a 8 horas

Tabela 15. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático a-EST para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Solução A:	
a-Naftil Acetato (40 mg/ml de acetona 50%)	1 ml
Tampão Fosfato de Sódio 0,05M pH 6.0	40 ml
Solução B:	
Fast Garnet GBC (30 mg/ml de n-propanol)	2 ml
Tampão Fosfato de Sódio 0.05M pH 6.0	40 ml
Procedimento: Imergir o gel na solução A por 20 minutos, em seguida adicionar a solução B. Temperatura: 37°C	

Tabela 16. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático G6PDH para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Ácido 6-fosfogluônico, Na ₃	20 mg
NADP	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
MgCl ₂ (1%)	1 ml
Tris Hcl 0,1M, pH 8,0	50 ml
Procedimento: Inocular no escuro, por 15-30 minutos a 30-37°C.	

Tabela 17. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático MDH para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Ácido Málico: DL – Ácido málico	10 g
Água destilada	80 ml
Procedimento: Ajustar o pH 8,0 com NaOH 1M, completar o vol. com 100 ml	
Produto	Quantidade
Ácido Málico 0,5M pH 8,0	4 ml
NAD	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
Tris Hcl 0,1M pH 8,5	50 ml
Procedimento: Inocular o gel no escuro, por 15-60 min em estufa a 37°C.	

Tabela 18. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático PRX para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
O-Dianisidina	30 mg
Etanol	25 ml
Tampão acetato de sódio pH 5,0 (0,2M)	25 ml
H ₂ O ₂ (30%)	1,5 ml
Procedimento: Agitar o Etanol e a Dianisidina, adicionar o tampão, inocular por 20 min. em estufa a 37°C e adicionar 2,0 ml de H ₂ O ₂ (3%)	

Tabela 19. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático SKDH para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Ácido Xiquímico	50mg
NADP	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
Tris Hcl 0,1M pH 8,5	50 ml
Procedimento: Inocular o gel no escuro, durante 30 a 60 min em estufa a 37°C.	

Tabela 20. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático PGI para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Frutose-6-fosfato	37,5 mg
MTT	1 ml
Tris – Hcl 0,1M, pH 8,0	50 ml
Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	0,01 ml
PMS	1 ml
MgCl ₂ (1%)	1 ml
NADP	1 ml
Procedimento: Adicionar G6PDH por último, incubar no escuro em estufa a 37°C.	

Tabela 21. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático IDH para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
DL- Ácido isocítrico, Na ₃	100 mg
NADP	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
MgCl ₂ (1%)	1 ml
Tris Hcl 0,1M pH 8,0	50 ml
Procedimento: Inocular o gel no escuro, por 15-20 min. em estufa a 37°C.	

Tabela 22. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático PGM para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Glucose- 1 - fosfato, Na ₂	125 mg
EDTA	25 mg
NADP	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
MgCl ₂ (1%)	1 ml
Tris Hcl 0,1M pH 8,5	50 ml
Glucose- 6 fosfato desidrogenase	0,02 ml
Procedimento: Adicione G6PDH por último. Ponha no escuro em estufa a 37°C.	

Anexo 2 - Coeficientes de autocorrelação espacial em subpopulações de *E. leiocarpa*

Tabela 23. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficientes I de Moran), para classes de distância, em 5 alelos de locos isoenzimáticos na subpopulação 1 de *E. leiocarpa*.

Loco	Alelo	Classe de Distância		
		1	2	3
Pgi1	1	-0,032	-0,137	-0,042
Est1	1	-0,206	-0,005	-0,015
	2	-0,236	0,039	-0,077
Prx1	1	0	-0,176	0
	2	-0,216	0,029	-0,1
Nº de Comparações		30	37	11

Tabela 24. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficientes I de Moran), para classes de distância, em 5 alelos de locos isoenzimáticos na subpopulação 2 de *E. leiocarpa*

Loco	Alelo	Classe De Distância	
		1	2
Pgi1	1	0,1	-0,12
Est1	1	-0,228	0,003
	2	-0,041	-0,152
Prx1	1	0,086	-0,221
	2	-0,235	0,008
Nº de Comparações		19	30

Tabela 25. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficientes I de Moran), para classes de distância, em 7 alelos de locos isoenzimáticos na subpopulação 3 de *E. leiocarpa*.

Loco	Alelo	Classe de				Distância
		1	2	3	4	
Mdh3	1	0,143	-0,048	-0,158	-0,07	-0,429
Pgi1	1	-0,134	0,018	-0,122	0,078	-0,379
	1	-0,114	-0,053	-0,077	0,19	-0,4
Est1	2	-0,214	0,003	0,1	-0,048	-0,25
Prx1	1	-0,155	0,148	-0,159	-0,23	-0,452
	2	-0,168	0,033	-0,04	-0,22	-0,041
N ^o de Comparações		35	76	52	21	5

Tabela 26. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficientes I de Moran), para classes de distância, em 9 alelos de locos isoenzimáticos na subpopulação 4 de *E. leiocarpa*.

Loco	Alelo	Classe de		Distância
		1	2	
Mdh1	1	0,048	-0,51	0,077
Mdh3	1	-0,001	-0,343	0,014
Pgi1	1	0,169	-0,222	-0,287
	2	-0,189	-0,212	0,151
Est1	1	-0,03	-0,093	-0,133
	2	-0,133	0,008	-0,04
Prx1	1	-0,126	0,212	-0,226
	2	-0,126	0,212	-0,226
	3	-0,189	0,058	-0,021
N ^o de Comparações		37	22	31