SECRETÁRIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

DIVERSIDADE GENÉTICA, TAXA DE CRUZAMENTO E ESTRUTURA ESPACIAL DOS GENÓTIPOS EM UMA POPULAÇÃO DE *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

Flávio Bertin Gandara

Orientador: Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Campinas -São Paulo
1996

G151d

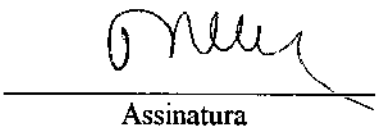
37277/BC

LOCAL E DATA: Campinas, 01 de fevereiro de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

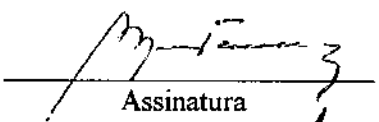
TITULARES:

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama (Orientador)



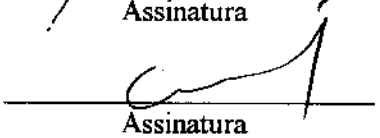
Assinatura

Prof. Dr. Roland Vencovsky



Assinatura

Prof. Dr. George Sheppard



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Flávio Antonio Maës dos Santos

Assinatura

APROVADA

DIVERSIDADE GENÉTICA, TAXA DE CRUZAMENTO E ESTRUTURA ESPACIAL DOS GENÓTIPOS EM UMA POPULAÇÃO DE *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) Flávio Bertin Gandara
e aprovada pela Comissão Julgadora.
12/12/96

Flávio Bertin Gandara

Orientador: Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências

990864

Campinas -São Paulo
1996

UNIDADE BC
Nº CHAMADA:
137277
229/99
R$ 11,00
09/04/99
Nº CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00122035-5

Gandara, Flávio Bertin
G151d Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de Cedrela fissilis Vell. (Meliaceae) / Flávio Bertin Gandara. -- Campinas, SP [s.n.], 1996.

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

1. Genética vegetal. 2. Cruzamento (Genética). 3.* Cedrela fissilis. 4. Plantas - Conservação. I. Kageyama, Paulo Yoshio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

À minha família,
que sempre me incentivou e apoiou

Dedico

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas e instituições contribuíram em diversos momentos para que este trabalho fosse realizado. A todos serei sempre grato. Especiais agradecimentos ficam aqui registrados:

Ao Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama pela dedicada amizade e valiosa orientação, a quem mais devo este trabalho.

Aos colegas, professores e funcionários da UNICAMP e ESALQ pelas idéias, discussões e apoio no desenvolvimento deste trabalho, e pela grande oportunidade de convivência e aprendizagem.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas: Elza Santos, Teresa, Ademir, Luis Ginzaga, Fátima, Alexandre Borges, Sueli, Lina, Helena, Cristina, Eduardo, Alexandre, Casio, Zezé, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Nadja Lepsch-Cunha e Maurício Sedrez dos Reis, que muito contribuíram para este trabalho e por sua amizade.

À Elza Martins Ferraz pelo grande auxílio nas atividades de laboratório.

Ao Seu Vieira pelo apoio e muitos ensinamentos na mata.

Ao IPEF e seus funcionários pelo apoio em diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Roland Vencovsky, George Sheppard e Flávio A. Maës dos Santos pelas valiosas sugestões durante o exame de análise prévia da tese.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Ao CNPq, FAO e Fundação Botânica Margaret Mee pelo apoio financeiro.

À Fundação para a Conservação e Produção Florestal do Estado de São Paulo pelo apoio às atividades de campo.

SUMÁRIO

Dedicatória ii

Agradecimentos iii

Resumo vi

Summary viii

Capítulo I: Introdução 1

Cedrela fissilis Vell. 5

Capítulo II: Variação Isoenzimática e Diversidade Genética em uma População Natural de *Cedrela fissilis* Vell. 8

1. Introdução 8

2. Metodologia: 9

2.1. Local de estudo e coleta de material 9

2.2. Análises eletroforéticas 11

2.3. Metodologia Estatística 17

3. Resultados: 18

3.1. Levantamento da população 18

3.2. Interpretação genética 20

4. Discussão: 27

Capítulo III: Sistema Reprodutivo e Taxa de Cruzamento
em uma População Natural de *Cedrela fissilis* Vell. 30
1. Introdução 30
2. Metodologia: 32
2.1.Taxa de cruzamento 32
2.2. Ocorrência de cruzamentos ao acaso 33
2.3. Distância de fluxo de pólen 34
3. Resultados: 35
4. Discussão: 39

Capítulo IV: Estrutura Genética Espacial de uma
População Natural de *Cedrela fissilis* Vell. 45
1. Introdução 45
2. Metodologia: 47
3. Resultados: 50
4. Discussão: 56

Capítulo V: Considerações Finais 58
Conclusões 61

Referências Bibliográficas 62

DIVERSIDADE GENÉTICA, TAXA DE CRUZAMENTO E ESTRUTURA ESPACIAL DOS GENÓTIPOS EM UMA POPULAÇÃO DE *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

Autor: Flávio Bertin Gandara

Orientador: Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama

Resumo

Com a finalidade de se estimar a diversidade genética e a taxa de cruzamento em uma espécie arbórea rara, ou seja, com baixa densidade populacional, foi estudada uma população natural de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). A população está situada na Fazenda Intervales pertencente à Fundação para a Conservação e Produção Florestal do Estado de São Paulo, localizada no município de Sete Barras-SP. Na área levantada, *Cedrela fissilis* é uma espécie rara, onde ocorrem 34 indivíduos adultos em uma área de 270 ha (densidade média de cerca de 1 indivíduo a cada 8 ha).

Para a estimativa dos parâmetros genéticos, foi utilizada a técnica de eletroforese de isoenzimas em gel horizontal de amido. Foram analisados 34 indivíduos adultos e 5 famílias de 30 indivíduos cada, formadas a partir da coleta de sementes em 5 árvores da população. Foram utilizados 7 sistemas enzimáticos (6-PGDH, PGI, G2DH, IDH, MDH, PO), resultando em 13 locos gênicos.

Para os indivíduos adultos, obteve-se os seguintes parâmetros: heterozigosidade média = 0,222, heterozigosidade para os locos polimórficos = 0,288, porcentagem de locos polimórficos = 76,9% e número médio de alelos por loco = 2,31. Para as famílias, obteve-se os seguintes parâmetros: heterozigosidade média = 0,193, heterozigosidade para os locos polimórficos = 0,228, porcentagem de locos polimórficos = 84,6% e o número médio de alelos por loco = 2,38. A população adulta está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém as famílias diferiram significativamente das expectativas do equilíbrio.

O valor médio da taxa de cruzamento aparente (t_a) estimado a partir do coeficiente de endogamia foi de 0,85. A taxa de cruzamento multiloco (t_m) foi de 0,92, sendo que os valores da taxa de cruzamento individuais para cada árvore variaram de 0,62 a

1,08. A média das taxas de cruzamento para cada loco (t_s) foi de 0,83, inferior a t_m, mas sem diferir desta significativamente. As 5 árvores matrizes foram fecundadas por um conjunto de pólen homogêneo, indicando a ocorrência de cruzamentos aleatórios.

Através da ocorrência de alelos exclusivos às famílias foi estimada a distância mínima de caminhamento de pólen (distância das árvores matrizes até a borda da área levantada) que atingiu o valor de 950 m.

Para o estudo da estrutura genética espacial foi empregada a análise da autocorrelação espacial, utilizando-se o índice I de Moran. O pequeno número de valores significativos encontrado sugere que a distribuição espacial dos genótipos é aleatória.

Os resultados mostram que a população de *Cedrela fissilis* estudada, apesar de ter uma baixa densidade de indivíduos adultos, apresenta altas taxa de cruzamento, amplo fluxo de pólen, cruzamentos ao acaso e distribuição espacial aleatória de genótipos.

Portanto, as suposições de que espécies raras estariam sujeitas a um fluxo gênico via pólen restrito, apresentariam auto-fecundação e cruzamentos preferenciais, e teriam populações estruturadas geneticamente, não se aplica a esta população de *Cedrela fissilis*.

As principais conclusões deste trabalho são:

1. A diversidade genética apresentada pela população estudada de *Cedrela fissilis* (H=0,222) está na média das populações de espécies arbóreas tropicais já estudadas.

2. *Cedrela fissilis* é uma espécie preferencialmente alógama (t_m=0,92), porém pode apresentar variações da taxa de cruzamento entre árvores ($t_{individual}$ entre 0,62 e 1,08).

3. O fluxo gênico via pólen em *Cedrela fissilis* pode ocorrer a longa distância (acima de 950 m) o que condiz com as grandes distâncias encontradas entre indivíduos.

4. A população de *Cedrela fissilis* não apresenta estruturação genética, o que evidencia que o fluxo gênico é suficientemente amplo para prevenir a formação de estrutura genética a partir da deriva genética e/ou da seleção local.

5. Os resultados obtidos sobre o fluxo gênico via pólen, sistema reprodutivo e distribuição espacial dos genótipos são concordantes entre si e são coerentes com a baixa densidade da população.

GENETIC DIVERSITY, OUTCROSSING RATE AND GENETIC SPATIAL STRUCTURE IN A POPULATION OF *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

Author: Flávio Bertin Gandara

Adviser: Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama

Summary

A natural population of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) was surveyed with the aim of estimating the genetic diversity and the outcrossing rate of a rare tree species, that is, a species with low populational density. The population site was at the Fazenda Intervales belonging to the "Fundação para a Conservação e Produção Florestal do Estado de São Paulo", located at Sete Barras - São Paulo State. In the study area, *Cedrela fissilis* is a rare species, where 34 adult trees occur in an area of 270 ha (mean density of one tree for 8 ha).

To estimate the genetic parameters, the technique of isozyme electrophoresis in horizontal strach gels was applied. Thirty-four adult trees and 5 families with 30 individuals each, formed from seeds collected directly from 5 trees of the population were analized. Seven enzymatic systems (6-PGDH, PGI, G2DH, IDH, MDH, PO), resulting in 13 genetic loci, were utilized.

For adult trees, the parameters was: mean heterozigosity = 0.222, heterozigosity for the polimorphic loci = 0.288, percentage of polimorphic loci = 76.9% and mean number of alleles per locus = 2.31. For families, the parameters was: mean heterozigosity = 0.193, heterozigosity for the polimorphic loci = 0.228, percentage of polimorphic loci = 84.6% and mean number of alleles per locus = 2.38. The adult population was in Hardy-Weinberg equilibrium, but the families differed significantly from the equilibrium expectations.

The mean apparent outcrossing rate (t_a) estimated from the coefficient of inbreeding was 0.85. The multilocus outcrossing rate (t_m) was 0.92, but the individual

outcrossing rates for each tree varied from 0.62 to 1.08. The mean single outcrossing rates (t_s) was 0.83, therefor lower than t_m, but did not differ significantly from it. All mother trees were fertilized by an homogeneous pollen pool, indicating random outcrossing.

Utilizing alleles exclusives to the families, the minimum distance of pollen flow (distance between the mother tree and the border of the surveyed area) was estimated and reached 950 m.

To study the spatial genetic structure, spatial autocorrelation analysis through the I index of Moran was utilized. The small number of significant values showed that spatial distribution of genotypes is random.

The results of this research show that the population of *Cedrela fissilis*, in spite of having a low density of adult trees, exhibits a high outcrossing rate, extensive pollen flow, random outcrossing and random spatial distribution of genotypes.

Therefore, the presumptions that rare species exhibit limited gene flow by polen, show self-fertilization and biparental breeding, and have genetic structured populations do not apply to this population of *Cedrela fissilis*.

The main conclusions of this study are:

1. The genetic diversity showed by this population of *Cedrela fissilis* (H=0.222) is on the average for the populations of tropical tree species already studied.

2. *Cedrela fissilis* is preferably alogamous (t_m=0.92), but can show variations among trees in the outcrossing rate ($t_{individual}$ between 0.62 and 1.08).

3. The gene flow by pollen in *Cedrela fissilis* can reach a considerable distance (over 950m) agreeing with the low density of trees.

4. The population of *Cedrela fissilis* does not show genetic structure, suggesting that gene flow is sufficiently wide to prevent genetic structuring due to genetic drift and/or local selection.

5. The results for gene flow by pollen, breeding system and spatial distribution of genotypes agree amongst each other and are coherent with the low population density.

Capítulo I

Introdução

Um problema fundamental na definição de parâmetros para o estabelecimento de reservas para conservação genética é o da escolha de espécies referência para este propósito. As espécies raras, ou aquelas que ocorrem a uma baixa densidade de plantas por unidade de área, têm sido apontadas como as mais indicadas para este fim, por exigirem grandes áreas para a manutenção de suas populações.

Estudos no sentido de indicar estratégias de conservação são imprescindíveis, principalmente em ecossistemas tão ameaçados como a Floresta Tropical Atlântica, onde atualmente existem apenas alguns relictos encontrados em unidades de conservação. Um estudo realizado em 1975 mostrou que apenas 5% de toda a área do estado de São Paulo encontrava-se com cobertura vegetal nativa, sendo que 98% daquela cobertura remanescente compreendia a Floresta Tropical Atlântica (VICTOR, 1975).

Em levantamentos fitossociológicos nas florestas do Estado de São Paulo, constata-se que em torno de 30% das espécies apresentaram somente um indivíduo em toda a área amostral (1 ha ou menos), sendo consideradas raras e, dessa maneira, não se podendo fazer nenhuma inferência sobre suas populações (KAGEYAMA et al., 1992). Por outro lado, deve-se enfatizar que a alta diversidade de espécies da floresta tropical é dada muito mais pelas espécies mais raras do que pelas comuns.

FOSTER e HUBBELL (1990) mostraram que de 409 espécies arbóreas e arbustivas conhecidas na Ilha de Barro Colorado - Panamá (1500 ha), somente 306 ocorreram em uma parcela de 50 ha estudada. Os autores perguntam sobre que características especiais fariam com que 103 espécies não ocorressem na parcela. Sessenta e um porcento das espécies que não estavam na parcela são listadas como muito raras. LEÃO (1990), em levantamento de uma parcela de 400 ha na Amazônia, encontrou que uma das espécies mais raras (*Ceiba pentandra* - Bombacaceae) ocorria a uma densidade de 1 indivíduo a cada 33 ha.

BAWA e ASHTON (1991) distinguem 4 tipos de raridade em espécies arbóreas tropicais:

1. Espécies uniformemente raras, ou seja, espécies que ocorrem tipicamente em populações com baixa densidade, ou menos que um indivíduo reprodutivo por hectare;

2. Espécies que são comuns em alguns lugares e raras em outros;

3. Espécies endêmicas, ou seja, espécies com distribuição geográfica restrita; e

4. Espécies com distribuição agrupada, mas que apresentam uma densidade populacional baixa.

Neste trabalho será discutido o tipo 1 de raridade que, no entanto, tem-se alguns pontos a acrescentar. Apesar de no tipo 2 serem incluídas as espécies que se apresentam comuns em alguns lugares e raras em outros, considera-se que as espécies do tipo 1 também passem por variações na sua densidade. Porém, nestas espécies, a densidade não atingiria valores elevados a ponto de serem consideradas como comuns. Os próprios autores desta classificação citam que as espécies raras têm maior probabilidade de experimentarem maiores flutuações que as espécies mais comuns. Aqui, são consideradas somente populações naturais, sendo excluídas as situações antrópicas, que podem causar grandes perturbações populacionais e alterações nos seus parâmetros, dentre eles a densidade.

Este tipo de raridade pode trazer algumas conseqüências genéticas que serão discutidas a seguir. As espécies arbóreas tropicais são predominantemente alógamas, o mesmo acontecendo para as espécies raras (BAWA e O'MALLEY, 1987; MURAWSKI e HAMRICK, 1991; O'MALLEY e BAWA, 1987; O'MALLEY et al., 1988). Dessa forma, é de se esperar que estas espécies tenham mecanismos eficientes de polinização e dispersão a longa distância e, conseqüentemente, apresentem extenso fluxo gênico.

Assim, as espécies raras que apresentarem estas características, que levam a um fluxo gênico a longa distância, não estariam sujeitas a perdas de diversidade genética dentro de populações. Mas, pelo contrário, podem conter considerável variação genética (BAWA e ASHTON, 1991). Este fato pode ser confirmado por alguns trabalhos já realizados com espécies arbóreas tropicais raras (O'MALLEY e BAWA, 1987; BUCKLEY et al., 1988; HAMRICK e LOVELESS, 1989; HAMRICK e MURAWSKI, 1991). Outra conseqüência esperada do fato de o fluxo gênico ocorrer a longas distâncias, é a pequena divergência genética entre populações. No entanto, a divergência genética entre populações de espécies arbóreas raras foi ainda pouco estudada.

BAWA e ASHTON (1991) consideraram que flutuações temporais na dispersão e na densidade populacional de espécies uniformemente raras devem ter pouco ou nenhum efeito no potencial reprodutivo de cada árvore, por causa do potencial de dispersão de pólen a grandes distâncias.

A raridade ou não das espécies pode ser considerada como uma característica associada a uma série de características evolutivas, como padrões de sistema reprodutivo, tipo de polinização, dispersão de sementes e predação de sementes/plântulas e, portanto, intrínseca às mesmas. Dessa forma, o estudo do comportamento de populações de espécies raras pode dar indicações importantes sobre esse segmento essencial da comunidade.

Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar a raridade de espécies arbóreas, sendo as mais mencionadas a de Janzen-Connel (JANZEN, 1970; CONNELL, 1971) e a de HUBBELL e FOSTER (1986). A primeira relaciona a raridade à presença de predadores específicos que manteriam um anel ao redor da matriz onde não ocorreria a regeneração da espécie; a segunda aponta que as espécies raras apresentam especialização em sítios de regeneração, tais como as clareiras.

Neste contexto, três considerações a respeito de espécies raras devem ser discutidas:

I. A raridade de uma espécie pode ser considerada uma característica intrínseca à mesma e, portanto, é resultante de sua história evolutiva.

Esta característica está assim ligada com fatores como alcance dos polinizadores e dispersores, estratégias de regeneração e padrões de herbivoria. Estas espécies são as que ilustram a hipótese de Janzen-Connel, formando padrões de dispersão espacial dependentes da distância aos indivíduos adultos.

II. Para as espécies raras devem existir mecanismos alternativos de reprodução, como auto-polinização e agamospermia.

KAGEYAMA (1990) considera que a freqüência de auto-compatibilidade e também de auto-polinização pode ser maior em espécies que se encontram em baixas densidades. A capacidade de se reproduzir sob condições que resultem em baixa polinização cruzada, levando a taxas intermediárias de alogamia, deve ser um componente importante na adaptação a condições de baixa densidade.

III. As espécies raras devem apresentar uma estrutura genética característica, diferenciada das espécies comuns.

Fatores já levantados como seleção dependente da densidade, polinizadores mais específicos e mecanismos alternativos de reprodução devem contribuir para diferenciar populações de espécies raras e comuns.

Pelos fatos apresentados, estas espécies raras requerem uma grande área para a sua conservação. Os indivíduos esparsos ocupando uma área muito extensa e unidos por fluxo gênico formam populações abrangendo grandes áreas. Dessa forma, a redução na área ocupada por uma população poderia gradualmente levar ao aumento da endogamia em um número limitado de indivíduos de uma dada reserva. Todavia, a endogamia não resultaria em uma perda substancial de variação genética ao menos que continuasse por várias gerações (BAWA e ASHTON, 1991). Porém a endogamia pode levar à diminuição do potencial reprodutivo, que também pode diminuir pela redução no movimento de pólen entre indivíduos mais espaçados

As espécies raras podem ser consideradas como indicadores importantes para a definição de tamanhos de reservas genéticas (KAGEYAMA e GANDARA, 1993). Pelo fato das populações de espécies raras ocuparem áreas muito mais extensas que as espécies comuns, desde que aquelas estiverem conservadas, estas terão grandes chances de também estarem.

A espécie escolhida para este trabalho, como modelo de população de espécie rara, foi o Cedro - *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) - que na Floresta Tropical Atlântica pode apresentar baixa densidade.

Além desse fato, esta é uma espécie de madeira de alto valor econômico e, por isso, vem sendo extraída em grande quantidade em muitas regiões. Soma-se a isso o fato de que o corte de áreas florestais da região centro-sul do Brasil ocorre em ritmo muito acelerado, resultando que esta espécie fique sujeita a uma forte redução de suas populações. Por este fato, a variabilidade genética existente na espécie pode estar sofrendo um processo de erosão que levará a um comprometimento de várias populações. Desta maneira, faz-se necessário elaborar estudos sobre a conservação desta e de outras espécies raras.

Cedro - *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

Cedrela fissilis Vell. é uma árvore caducifólia, normalmente com 10 a 25 m de altura e 40 a 80 cm de DAP, podendo atingir até 40 m de altura e 200 cm de DAP. O tronco é cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, com sapopemas pouco desenvolvidas ou ausentes e fuste com até 15 m de comprimento, tendo a casca espessura de até 40 mm com fissuras longitudinais profundas e largas, muito típicas. Apresenta folhas compostas, paripinadas, geralmente com 25 a 45 cm, chegando até 140 cm de comprimento e com até 30 pares de folíolos oblongo-lanceolados. Possui flores unissexuais por aborto, amarelas a creme, com 12 mm de comprimento, reunidas em tirsos axilares com 30 cm de comprimento em média, às vezes alcançando até 60 cm. O fruto é uma cápsula lenhosa deiscente com 3 a 10 cm de comprimento e com 30 a 100 sementes viáveis por fruto. A semente é alada com até 3,5 cm de comprimento (PINHEIRO et al., 1990b; CARVALHO, 1994)

A floração ocorre em seguida à grande brotação anual (de setembro a janeiro), após o término do período seco. A dispersão pelo vento das sementes ocorre no próximo período seco (normalmente de junho a setembro), juntamente com a deciduidade das folhas (PINHEIRO et al., 1990a).

Esta é uma espécie extremamente variável, especialmente com relação ao número de folíolos por folha, quantidade e tipo de indumento e tamanho do fruto. Tal variação talvez reflita o grande número de sinonímias e variedades descritas para a espécie (PENNINGTON e STYLES, 1981), o que tem gerado problemas de ordem nomenclatural e de distribuição geográfica (AMARAL, 1981).

STYLES (1972) cita a presença de dicogamia (protoginia), que, aliada à monoicia, aumentaria as chances de cruzamento. CARVALHO (1994) considera a espécie alógama pelo fato das flores unissexuais amadurecerem em tempos diferentes. A polinização é possivelmente realizada por mariposas (MORELLATO, 1991) e abelhas (CARVALHO, 1994). STYLES (1972) sugere que a espécie seja entomófila, sendo que o aroma de suas flores pode ser detectado a considerável distância.

A espécie ocorre em florestas desde o nível do mar até cerca de 800 m de altitude, com uma distribuição ampla na América Latina desde o norte da Argentina até o Panamá e Costa Rica (PENNINGTON e STYLES, 1981). No Brasil, é de ocorrência comum nas

regiões leste e sul, podendo chegar ao Brasil Central, ao norte a ao nordeste (RAMALHO, 1978). Segundo REITZ et al. (1978), é uma espécie de distribuição muito ampla, crescendo em todo o Brasil.

Enquanto árvores de cedro podem ocorrer como indivíduos esparsos nas florestas não perturbadas, onde suas copas pertencem ao estrato superior, elas são mais numerosas em áreas de florestas secundárias (SMITH e EARLE, 1960). NOGUEIRA (1977) também afirma que é uma árvore esparsa nas matas, sendo que na formação da floresta heterogênea apenas as plantas isoladas são as que se desenvolvem perfeitamente. Muitas delas se deformam ou mesmo morrem devido ao ataque da broca do cedro - *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepdoptera: Pyralidae). Segundo CARVALHO (1994), a freqüência do cedro nas florestas do sul do Brasil, varia de uma a três árvores por ha, considerando ser esta baixa densidade a estratégia encontrada pela espécie para fugir do ataque da broca do cedro.

A broca do cedro ataca brotações, ramos e frutos, destruindo as sementes. Nos ramos, tem uma preferência marcante pelo ponteiro apical, que exuda goma e morre. A planta reage com novas brotações, mas quando o ataque é intenso o crescimento é paralisado (PEDROSA-MACEDO, 1993)

A regeneração em áreas de floresta perturbada e áreas abandonadas é bastante efetiva, resultando em áreas com alta densidade de indivíduos. Não obstante, estas populações devem estar geneticamente degradadas e em condições precárias, sob contínua ameaça de exploração ou de mudanças no uso da terra (CHAPLIN, 1980).

A madeira do cedro é leve (densidade aparente 0,53 g/cm^3), tem moderada resistência a organismos xilófagos, é indicada para móveis finos, folhas faqueadas decorativas, molduras, obras de entalhe, artigos de escritório, instrumentos musicais, construções internas (venezianas, rodapés e outros), sendo, dentre as madeiras leves, uma das que tem maior diversificação de utilizações (MAINIERI e CHIMELO, 1989).

Segundo FAO (1986), apresenta atualmente uma distribuição rarefeita e esparsa, sendo que os melhores fenótipos para utilização madeireira de muitas procedências já desapareceram, apesar da espécie como um todo não estar em perigo. A exploração das melhores áreas é uma das principais razões para o declínio da espécie, sendo que em muitas delas restaram apenas os indivíduos com pior forma silvicultural. FAO (1986) também acrescenta que a espécie como um todo está sofrendo de severa erosão genética pela perda de muitas populações e indivíduos. PINAZZO (1992) acrescenta *C. fissilis* como uma espécie em perigo de extinção no Paraguai, por estar sofrendo uma exploração comercial extensa e irracional.

Segundo STYLES e VOSA (1971) e STYLES e KHOSLA (1976), *Cedrela fissilis* apresenta número de cromossomos de 2n=56, sendo um valor intermediário dentre as espécies da família. Segundo os mesmos autores, em *Cedrela odorata* foram encontradas séries aneuplóides com 2n=50 e 56, indicando a existência de raças, não existindo, porém, correlação entre diferenças no número de cromossomos e diferenças morfológicas nessa espécie.

Capítulo II

Variação Isoenzimática e Diversidade Genética em uma População Natural de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

1. Introdução:

Os estudos eletroforéticos são muito utilizados para descrever a organização da variação genética em populações naturais de plantas (HAMRICK et al., 1981; LOVELESS e HAMRICK, 1984; HAMRICK e LOVELESS, 1986). Porém alguns grupos de plantas, incluindo espécies arbóreas tropicais, são muito pouco estudados em relação aos níveis e distribuição da variação genética. Alguns estudos têm sido conduzidos em espécies arbóreas tropicais, principalmente na América Central (HAMRICK e LOVELESS, 1986; HAMRICK e MURAWSKI, 1991; EGUIARTE et al., 1992; PÉREZ-NASSER et al., 1993; HALL et al., 1994), mas muito poucos na América do Sul, em especial na Floresta Atlântica (MORAES, 1992; SANTOS, 1994; PAIVA, 1992)

Analisando-se as mobilidades eletroforéticas de enzimas produzidas por uma amostra de locos, é possível caracterizar os genótipos de cada indivíduo, bem como as distribuições gênicas de populações e espécies. O termo isoenzima, utilizado aqui, refere-se ao produto enzimático resultante da ação de diferentes alelos.

As isoenzimas são marcadores genéticos convenientes por exibirem algumas propriedades interessantes, tais como: alelos com expressão codominante, padrão de herança mendeliana e ausência de epistasia e pleiotropia (WENDEL e WEEDEN, 1989). Apesar das isoenzimas não revelarem toda a variação genética, elas têm vantagens tanto

econômicas como de rápida execução para estudos genéticos ao nível populacional, se comparadas com outras técnicas.

As informações sobre a diversidade genética em populações naturais são fundamentais para o progresso de duas áreas de grande interesse atual: especiação em florestas tropicais e conservação de recursos genéticos (BUCKLEY et al., 1988).

Neste trabalho são apresentadas estimativas da variação genética em uma população natural de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) na Floresta Tropical Atlântica do Estado de São Paulo, utilizando-se isoenzimas como marcadores genéticos. Os objetivos deste estudo são:

i) desenvolver o protocolo de análise eletroforética para *Cedrela fissilis*;

ii) quantificar a variabilidade genética em uma população natural e em famílias de polinização aberta de *Cedrela fissilis*.

2. Metodologia:

2.1. Local de Estudo e Coleta de Material

Para este estudo foi amostrada uma população de *Cedrela fissilis* localizada na Fazenda Intervales da Fundação para a Conservação e Produção Florestal do Estado de São Paulo, situada no Município de Sete Barras - São Paulo. O local estudado situa-se na Área de Proteção Ambiental da Serra do Mar próximo à Base Saibadela, entre 48°04'30"W e 48°06'15"W e entre 24°13'20"S e 24°14'00"S, com altitude entre 100 e 250 m. A Fazenda Intervales possui 38.354 ha e está interligada a três unidades de conservação (Parque Estadual de Carlos Botelho, Estação Ecológica de Xitué e Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira) totalizando cerca de 117.000 ha (Figura 1).

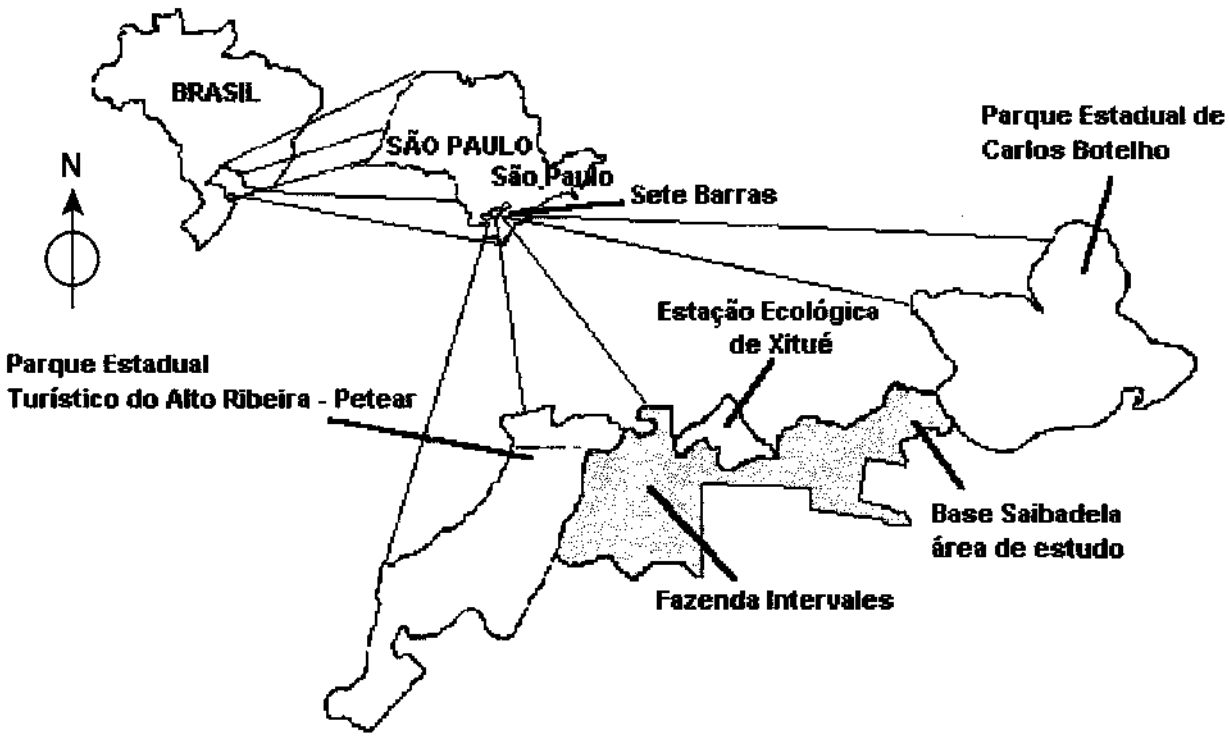


Figura 1. Localização da área de estudo: Base Saibadela - Fazenda Intervales, situada no Município de Sete Barras - São Paulo.

A área levantada apresenta uma cobertura vegetal constituída pela Floresta Ombrófila Densa, sob condições primitivas, sendo que não se tem notícias sobre grandes perturbações antrópicas no local.

Foram levantados 270 ha, onde todos os indivíduos de *Cedrela fissilis* considerados adultos (indivíduos reprodutivos) foram identificados e mapeados. Destas árvores (34 indivíduos adultos) foram coletados ramos durante o mês de dezembro de 1992, que foram levados ao Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP em Piracicaba - SP, onde foi feita a enxertia sobre mudas de *C. fisslis*.

Também foram coletadas sementes em 5 árvores (dentre as 34 levantadas) durante o mês de julho de 1992, sendo cada semente coletada de um fruto diferente (para evitar possíveis desbalanceamentos causados por cruzamento com pólen proveniente de uma única

ou poucas árvores) e colocadas para germinar com a finalidade de se produzir plântulas, num total de 30 para cada árvore. Estas árvores foram escolhidas dentre as com maior facilidade de acesso.

As análises eletroforéticas foram realizadas utilizando tecidos foliares de plântulas ou de mudas obtidas a partir de propagação vegetativa por enxertia.

Para as análises das progênies, foram utilizados folíolos de plantas com aproximadamente 6 meses a partir da semeadura, cultivadas em viveiro coberto com sombrite 50 %. Para as plantas adultas, foram utilizados folíolos de mudas obtidas a partir de propagação vegetativa por enxertia sobre porta-enxerto de *Cedrela fissilis*. Esta metodologia foi descrita por GANDARA (1993), que também observou a manutenção dos padrões isoenzimáticos a partir de folíolos de árvores adultas com mudas obtidas por enxertia.

2.2. Análises Eletroforéticas

A extração das enzimas foi feita através da maceração de aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar em placas de porcelana resfriadas utilizando-se cerca de 10 mg de areia lavada e 200 µl de solução de extração modificada (Tabela 1) a partir da solução de extração número 1 de ALFENAS et al. (1991).

Tabela 1. Solução de extração modificada a partir da solução de extração número 1 de ALFENAS et al. (1991).

Composto	Quantidade
fosfato de sódio bibásico (0,034 M)	0,6 g
sacarose (0,2 M)	7 g
polivinil pirrolidona PVP-40 (2,56 %)	2,56 g
L-ácido ascórbico	100 mg
dietilditiocarbamato DIECA (5,8 mM)	100 mg
bissulfito de sódio (2,6 mM)	50 mg
borato de sódio (2,5 mM)	50 mg
polietilenoglicol-6000 (1 %)	1 g
água destilada (q.s.p.)	100 ml

Os extratos obtidos eram absorvidos em pedaços de papel de filtro (papel whatman nº3) com 6 x 10 mm , sendo em seguida colocados no gel. Cada gel acondicionava 20 amostras além de dois pedaços de papel de filtro contendo solução marcadora de azul de bromofenol a 0,1% colocados nas extremidades.

Para a escolha dos sistemas enzimáticos foram realizadas análises preliminares de 22 enzimas, a saber:

álcool desidrogenase (ADH - EC 1.1.1.1),

aldolase (ALD - EC 4.1.2.13),

catalase (CAT - EC 1.11.1.6),

enzima málica (ME - EC 1.1.1.40),

esterase (EST - EC 3.1.1.1),

fosfatase ácida (ACP - EC 3.1.3.2),

fosfoglucomutase (PGM - EC 2.7.5.1),

6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH - EC 1.1.1.44),

fosfoglucose isomerase (PGI - EC 5.3.1.9),

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH - EC 1.2.1.12),

glicerato-2 desidrogenase (G2DH - EC 1.1.1.29),

glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH - EC 1.1.1.49),

glutamato desidrogenase (GDH - EC 1.4.1.3),

glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT - EC 2.6.1.1),

isocitrato desidrogenase (IDH - EC 1.1.1.42),

leucina aminopeptidase (LAP - EC 3.4.11.1),

malato desidrogenase (MDH - EC 1.1.1.37),

manitol desidrogenase (MADH - EC 1.1.1.67),

peroxidase (PO - EC 1.11.1.7),

sorbitol desidrogenase (SDH - EC 1.1.1.14),

superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1) e

xiquimato desidrogenase (SKDH - EC 1.1.1.25).

Também foram testados três sistemas de tampão gel/eletrodo: tris-citrato (SOLTIS et al., 1983), citrato morfolina (CLAYTON e TRETIAK, 1972) e histidina (STUBER et al.,1988).

A partir destes testes, foram escolhidos 7 sistemas enzimáticos pela sua boa resolução e constância a partir de tecidos de plântulas, bem como de mudas obtidas por enxertia. Os sistemas de tampão gel/eletrodo utilizados para cada sistema enzimático podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Sistemas de tampão gel/eletrodo e sistemas enzimáticos utilizados.

Enzima	**Sistema tampão gel/eletrodo**	**Concentração**	**amperagem**	**voltagem**
6PGDH G2DH IDH MDH PGI LAP	Citrato morfolina (CM)	eletrodo: ácido cítrico 0,04M titulação com N-(3-aminopropil) morfolina até pH 6,1 gel: tampão do eletrodo diluído a 1:20 (CLAYTON e TRETIAK,1972)	$i_{inicial}$ = 25 A $i_{após\ 30'}$= 35 A	$V_{inicial}$ =250 V $V_{após\ 30'}$=300 V
PO	Tris citrato (TC)	eletrodo: tris 0,223 M ácido cítrico 0,086 M pH 7,5 gel: tampão do eletrodo diluído a 3,5% (SOLTIS et al., 1983)	$i_{inicial}$ = 30 A $i_{após\ 30'}$= 35 A	$V_{inicial}$ =150 V $V_{após\ 30'}$=200 V

O meio suporte empregado para a eletroforese foi o gel de penetrose de milho, com concentração de 13 %. Foi utilizada a técnica de eletroforese de isoenzimas em géis horizontais mantidos a 10°C durante toda a corrida. Após 30 minutos do início da corrida os papéis de filtro eram retirados. A corrida levava cerca de 8:30 horas, quando o marcador de bromofenol atingia cerca de 9,0 cm de migração.

Após a migração, os géis eram cortados em cinco fatias de 2,0 mm de espessura cada uma e preparados para coloração.

Para a revelação das isoenzimas foram utilizados os seguintes protocolos:

a) 6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH - EC 1.1.1.44) - modificado a partir de SOLTIS et al. (1983):

ácido 6-fosfoglucônico, Na_3	20 mg
$NADP^+$, Na_2	10 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg
$MgCl_2$	10 mg
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 (q.s.p.)	50 ml

Procedimento: Os reagentes eram diluídos no tampão e os géis eram imersos nesta solução e incubados no escuro por 40 minutos a 35°C.

b) Fosfoglucose Isomerase (PGI - EC 5.3.1.9) - modificado a partir de SOLTIS et al. (1983):

frutose-6-fosfato, Na_2	37,5 mg
$NADP^+$, Na_2	10 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg
$MgCl_2$	10 mg
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 (q.s.p.)	50 ml
glucose-6-fosfato desidrogenase	0,01 ml (10 un)

Procedimento: Os reagentes eram diluídos no tampão e os géis eram imersos nesta solução e incubados no escuro por 40 minutos a 35°C.

c) Glicerato-2 Desidrogenase (G2DH - EC 1.1.1.29) - modificado a partir de YAMADA e GURIES (1989):

DL-ácido glicérico	50 mg
NAD^+, Na_2	10 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg
Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 (q.s.p.)	50 ml

Procedimento: Os reagentes eram diluídos no tampão e os géis eram imersos nesta solução e incubados no escuro por 1 hora a 35°C.

d) Isocitrato Desidrogenase (IDH - EC 1.1.1.42) - modificado a partir de SOLTIS et al. (1983):

DL-ácido isocítrico, Na_3	100 mg
$NADP^+$, Na_2	10 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg
$MgCl_2$	10 mg
Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 (q.s.p.)	50 ml

Procedimento: Os reagentes eram diluídos no tampão e os géis eram imersos nesta solução e incubados no escuro por 40 minutos a 35°C.

e) Leucina Aminopeptidase (LAP - EC 3.4.11.1) - modificado a partir de SOLTIS et al. (1983):

Solução A: Tris maleato 0,2 M, pH 3,3:

tris	24,2 g

ácido maleico	23,2 g
água destilada (q.s.p.)	1000 ml

Solução B: Hidróxido de Sódio 0,2 M

Misture 50 ml de A e 20 ml de B e complete com água a 200 ml resutando pH 6,0.

L-leucina-β-naftilamida - Hcl	5 mg
fast black K salt	10 mg
água destilada	15 ml
mistura de A + B	35 ml

Procedimento: Os reagentes eram diluídos no tampão e os géis eram imersos nesta solução e incubados no escuro por 1 hora a 30°C.

f) Malato Desidrogenase (MDH - EC 1.1.1.37) - modificado a partir de SOLTIS et al. (1983):

ácido málico 0,5 M, pH 8,0	2 ml
NAD^+, Na_2	10 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg
Tris-HCl 0,1 ml, pH 8,5 (q.s.p.)	50 ml

Procedimento: Os reagentes eram diluídos no tampão e os géis eram imersos nesta solução e incubados no escuro por 40 minutos a 35°C.

g) Peroxidase (PO - EC 1.11.1.7) - - modificado a partir de STUBER et al. (1988)

etanol	25 ml
O- dianisidina bi-HCl	30 mg

acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0 (q.s.p.)	25 ml
H_2O_2 (30%)	1,5 ml

Procedimento: A O-dianisidina era diluída no etanol e em seguida acrescentado o tampão acetato de sódio. Os géis eram imersos nesta solução e incubados no escuro por 30 minutos a 35°C. A seguir era acrescentada a água oxigenada e a revelação ocorria em 2 a 3 minutos.

Logo após a revelação das isoenzimas era feita a leitura dos zimogramas. As bandas eram desenhadas em filme plástico com canetas de retroprojetor, mantendo as dimensões originais. Os géis que apresentavam padrões incomuns eram também fotografados para permitir reproduções fiéis dos zimogramas, possibilitando a conferência posterior de dúvidas eventuais na interpretação.

As denominações dadas aos locos e alelos foram feitas da seguinte maneira: quando mais de uma isoenzima era analisada por sistema enzimático, o loco que controla a enzima com maior distância de migração foi identificado pelo número 1 (ex.: Mdh-1). Para cada loco, o alelo mais freqüente recebeu a denominação de 1 e os demais foram numerados conforme a distância de migração. Os alelos também foram identificados pela sua migração relativa (R_f), ou seja, pela relação entre a distância de migração da banda e a distância de migração do marcador de bromofenol.

2.3. Metodologia Estatística

A diversidade genética foi avaliada a partir das estimativas dos seguintes parâmetros: número médio de alelos por loco e por loco polimórfico, porcentagem de locos polimórficos a 99 % e a 95 %, heterozigosidade média esperada (H_e) e observada (H_o) e heterozigosidade observada para os locos polimórficos (H_p). Na estimativa do polimorfismo de um

determinado loco utilizou-se dois critérios, ou seja, considerou-se polimórfico aquele cuja freqüência do alelo mais comum não ultrapassava os valores de 0,95 ou 0,99.

A heterozigosidade foi calcula conforme BROWN e WEIR (1983) para um determinado loco:

$$\hat{H} = 1 - \sum_{i} p_{ii}$$

sendo: p_{ii} a freqüência de homozigotos para o i-ésimo alelo.

Para o cálculo destes parâmetros utilizou-se o programa BIOSYS desenvolvido por SWOFFORD e SELANDER (1989).

Para verificar os desvios da panmixia, na população estudada, realizou-se um teste de qui-quadrado (corrigido, quando necessário) entre os números observados e esperados de homozigotos e heterozigotos segundo as espectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para cada loco polimórfico.

Para se confirmar a suposição de panmixia, foi realizado um teste combinado de probabilidade (teste de Fisher) para todos os locos polimórficos, como descrito por STEEL e TORRIE (1980).

3. Resultados:

3.1. Levantamento da população

Na área de 270 ha foram encontradas 34 árvores adultas de *Cedrela fissilis*, consideradas assim por terem sido observadas em floração ou frutificação, o que leva a uma densidade de 0,13 indivíduos por hectare, ou um indivíduo a cada 7,9 hectares. A localização espacial das árvores pode ser observada na Figura 2, bem como dos indivíduos dos quais foram coletadas sementes.

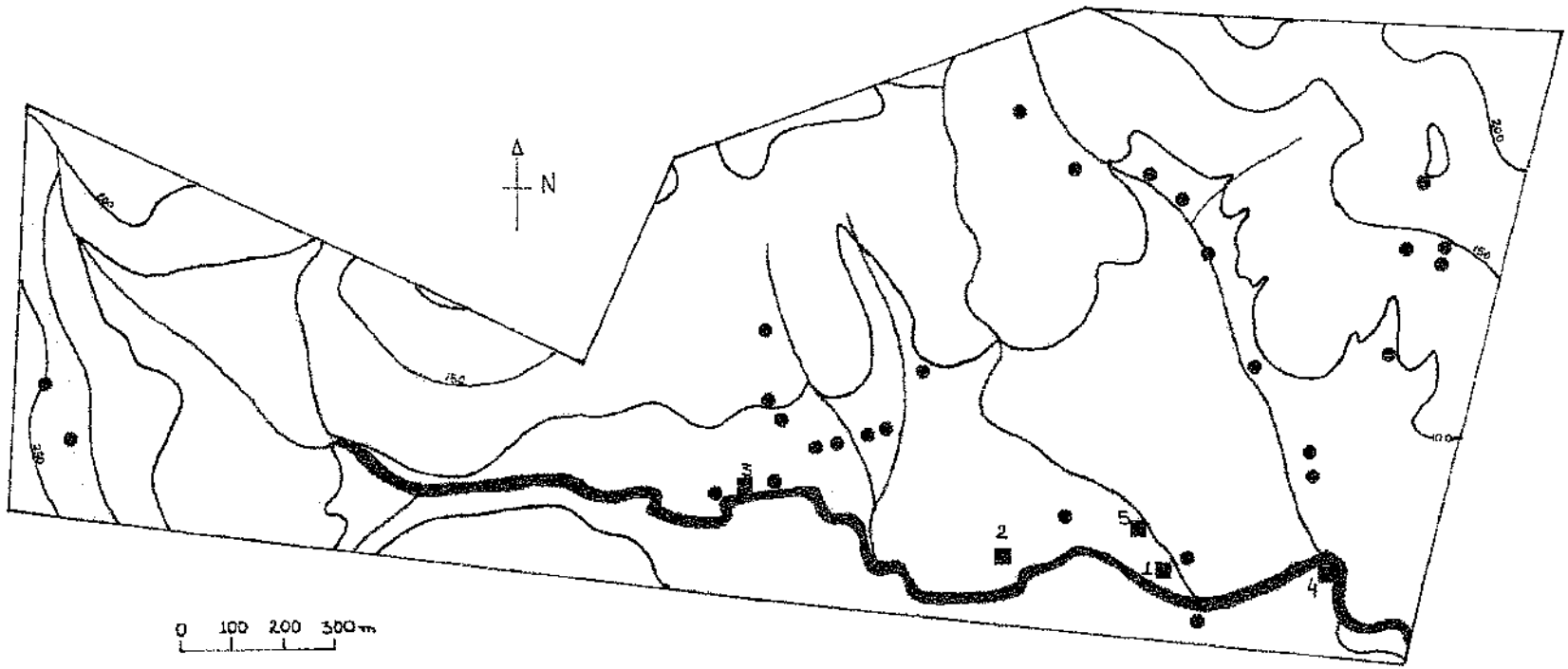


Figura 2. Localização dos 34 indivíduos adultos de *Cedrela fissilis* na área de estudo (270 ha) em Sete Barras-SP (quadrados vermelhos, números de 1 a 5, identificam as árvores matrizes das 5 famílias; círculos verdes identificam os demais indivíduos adultos).

3.2. Interpretação genética

As interpretações dos zimogramas são baseadas nos padrões de variabilidade de uma população de 34 indivíduos adultos e 5 famílias de polinização aberta, oriundas de sementes coletadas em 5 árvores das 34 levantadas. Estas interpretações são apresentadas esquematicamente na Figura 3 e são consistentes com padrões encontrados em outras espécies, principalmente no que se refere à estrutura das enzimas, número de locos por sistema enzimático e número de alelos por loco. As migrações relativas dos 32 alelos dos 13 locos podem ser observadas na Figura 4. A análise cuidadosa dos dados das famílias sustentam uma interpretação genética consistente dos zimogramas, sendo que os sistemas que exibiram padrões polimórficos seguiram as espectativas de segregação mendeliana.

6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH)

Este sistema revelou 2 zonas de atividade, sendo a mais catódica interpretada como um loco polimórfico e dialélico e a enzima formada por 2 subunidades (dímero). A outra região apresentou-se monomórfica.

Fosfoglucose isomerase (PGI)

Duas regiões são aparentes. A região mais rápida foi interpretada como uma loco monomórfico (R_f=70). A região mais lenta representa uma loco polimórfico e multialélico (5 alelos) com uma estrutura dimérica.

Glicerato-2 desidrogenase (G2DH)

Esta enzima apresenta apenas uma zona de atividade contendo um loco dialélico para uma enzima dimérica com uma migração relativa muito baixa ($R_{f\ alelo1}$ = 11 e $R_{f\ alelo2}$ = 16).

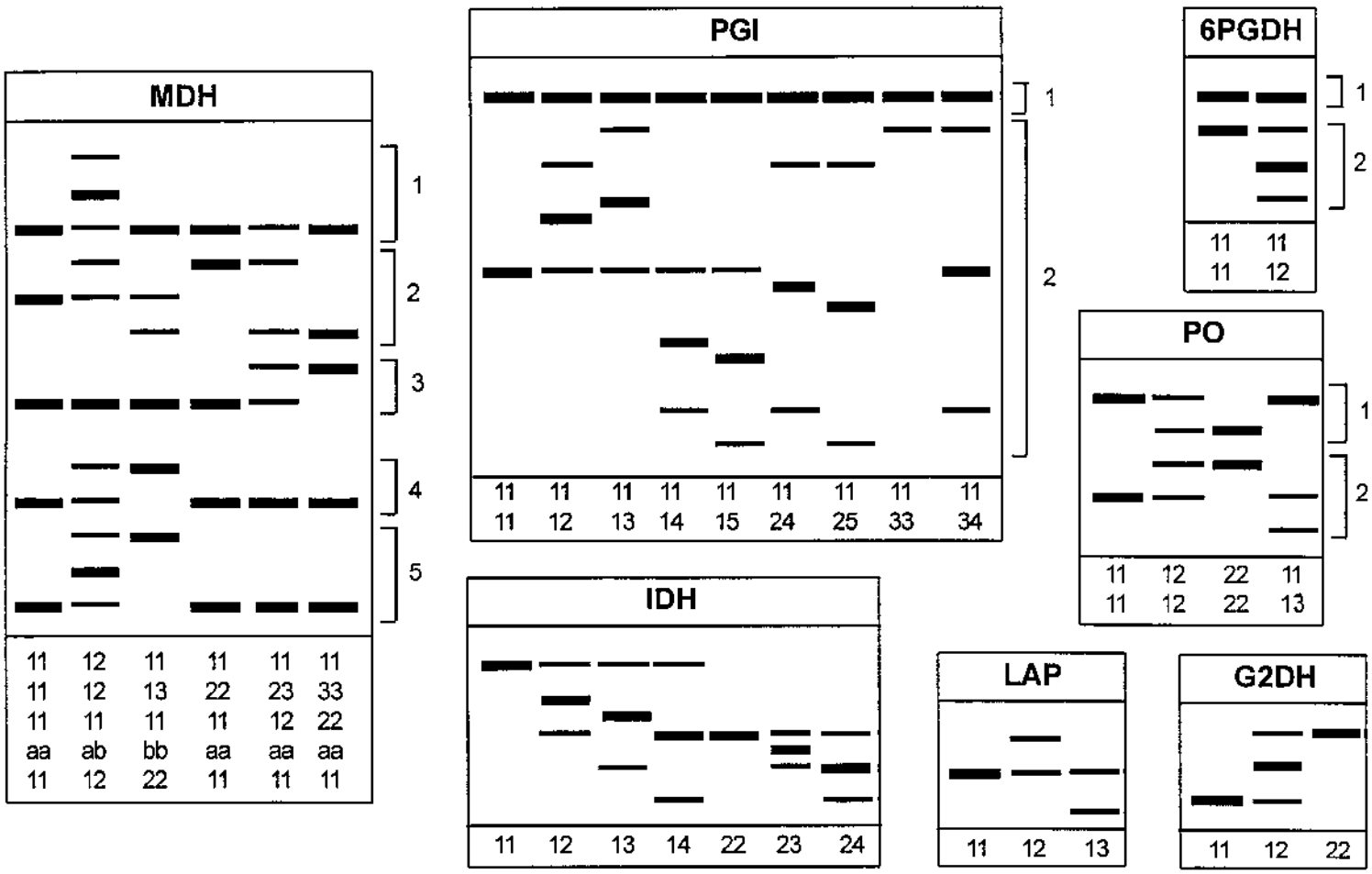


Figura 3. Esquemas dos zimogramas dos padrões eletroforéticos oriundos de uma população natural de *Cedrela fissilis*, apresentando os fenótipos e genótipos para 13 locos em 7 sistemas enzimáticos.

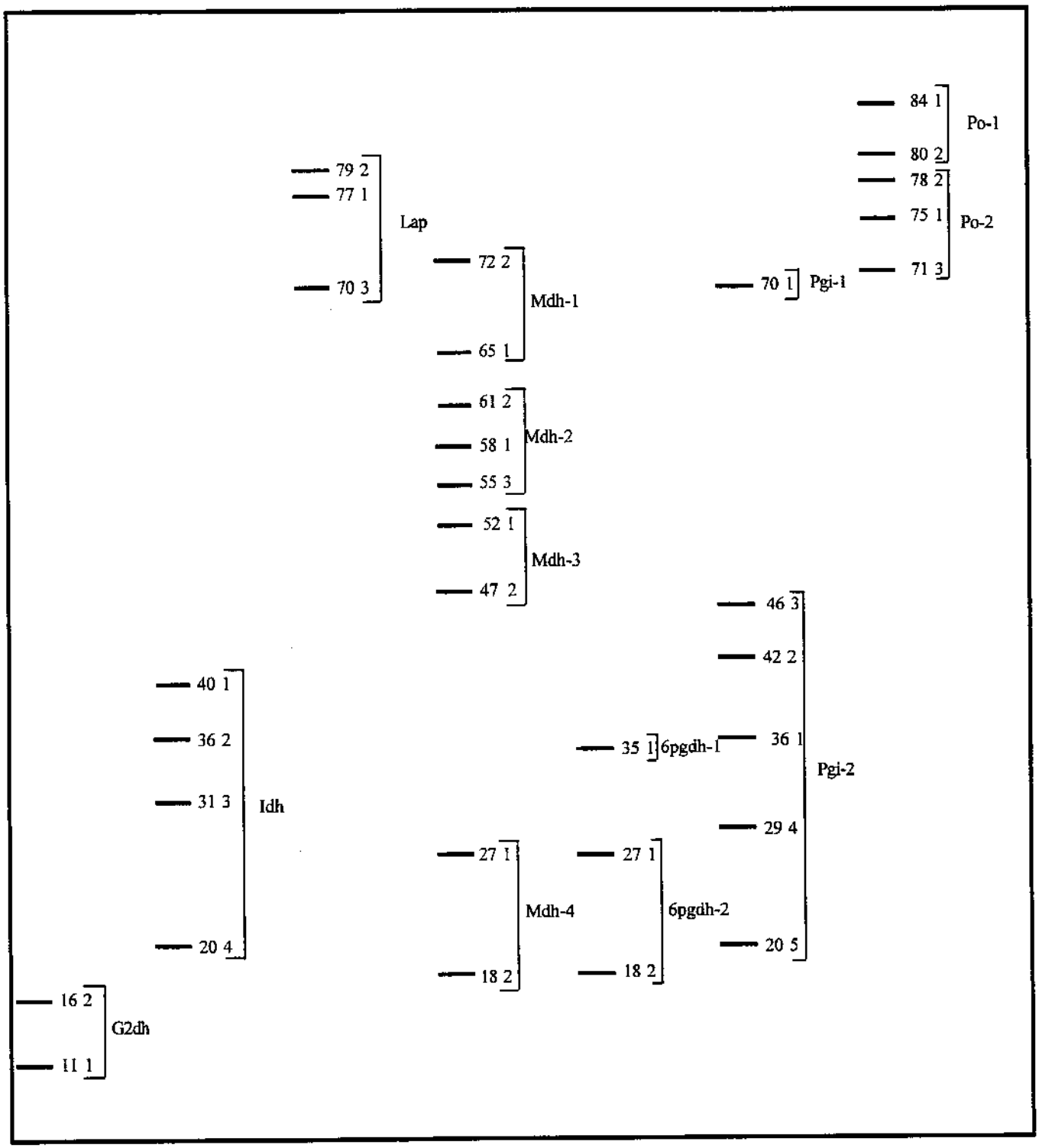


Figura 4. Migrações relativas (migração do marcador de bromofenol equivale a 100) dos 32 alelos de 13 locos para os sete sistemas enzimáticos estudadados em uma população natural de *Cedrela fissilis*.

Isocitrato desidrogenase (IDH)

Foi observada uma zona de atividade para o isocitrato desidrogenase com um loco representado por uma enzima dimérica, sendo que a população estudada apresentou 4 alelos com migração relativa de 20 a 40.

Leucina aminopeptidase (LAP)

A leucina aminopeptidase apresentou uma zona de atividade com um loco polimórfico com três alelos e estrutura monomérica (R_f entre 70 e 79).

Malato desidrogenase (MDH)

Os padrões de banda do MDH de *Cedrela fissilis* são complexos. São visíveis cinco zonas, sendo a mais catódica codificada por um loco polimórfico e dimérico contendo dois alelos (R_f=18 e 27). A região 4 é formada por um heterodímero inter-gênico entre os locos 3 e 4, sendo este polimórfico, dialélico (R_f=47 e 52) e localizado na terceira zona, sendo que os heterozigotos apresentaram comportamento de monômeros. A região 2 contém um loco polimórfico com 3 alelos e formado por uma enzima de estrutura monomérica. A região 1 apresenta um loco polimórfico, enzima com estrutura dimérica e constituído por 2 alelos, sendo uma bastante raro.

Peroxidase (PO)

A peroxidase exibiu três regiões, sendo a região mais catódica fraca e inconstante, mas aparentemente apresentando uma banda invariante. As outras duas regiões são constituídas por dois locos polimórficos e estrutura monomérica, sendo o loco Po-1 formado por 3 alelos e a Po-2 por 2 alelos.

Para a estimativa da variabilidade genética através de parâmetros isoenzimáticos, apresenta-se na Tabela 3 as freqüências de 32 alelos de 13 locos na população adulta e nas 5 famílias.

Tabela 3. Freqüências alélicas na população adulta, em cada família e em todas as famílias (POP - população adulta; FAM 1 a 5 - famílias de 1 a 5; FAMS - média das 5 famílias) de uma população natural de *Cedrela fissilis*.

LOCO	ALELO	POP	FAM 1	FAM 2	FAM 3	FAM 4	FAM 5	FAMS
6pgdh-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
6pgdh-2	1	0,853	0,783	1,000	0,733	0,817	0,867	0,840
	2	0,147	0,217	0,000	0,267	0,183	0,133	0,160
Pgi-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Pgi-2	1	0,691	0,883	0,783	0,717	0,933	0,917	0,847
	2	0,088	0,100	0,050	0,067	0,033	0,017	0,053
	3	0,162	0,017	0,167	0,083	0,033	0,067	0,073
	4	0,029	0,000	0,000	0,133	0,000	0,000	0,027
	5	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G2dh	1	0,926	0,967	0,950	0,733	0,983	0,983	0,923
	2	0,074	0,033	0,050	0,267	0,017	0,017	0,077
Idh	1	0,809	0,317	0,950	0,483	0,933	0,967	0,730
	2	0,132	0,667	0,050	0,217	0,067	0,017	0,203
	3	0,044	0,017	0,000	0,017	0,000	0,017	0,010
	4	0,015	0,000	0,000	0,283	0,000	0,000	0,057
Lap	1	0,941	0,983	0,917	0,983	0,983	0,967	0,967
	2	0,059	0,017	0,083	0,000	0,000	0,033	0,027
	3	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017	0,000	0,007
Mdh-1	1	1,000	0,950	0,967	1,000	1,000	1,000	0,983
	2	0,000	0,050	0,033	0,000	0,000	0,000	0,017
Mdh-2	1	0,750	0,567	0,817	0,200	0,750	0,700	0,607
	2	0,235	0,433	0,183	0,467	0,250	0,300	0,327
	3	0,015	0,000	0,000	0,333	0,000	0,000	0,067
Mdh-3	1	0,897	0,967	1,000	1,000	0,967	1,000	0,987
	2	0,103	0,033	0,000	0,000	0,033	0,000	0,013
Mdh-4	1	0,647	0,483	0,783	0,500	0,550	0,783	0,620
	2	0,353	0,517	0,217	0,500	0,450	0,217	0,380
Po-1	1	0,750	0,200	0,500	0,967	0,517	0,883	0,613
	2	0,250	0,800	0,500	0,033	0,483	0,117	0,387
Po-2	1	0,735	0,900	0,567	0,967	0,967	0,900	0,860
	2	0,250	0,033	0,433	0,017	0,033	0,100	0,123
	3	0,015	0,067	0,000	0,017	0,000	0,000	0,017
n		34	30	30	30	30	30	150

n - número de indivíduos analisados

Dos 13 locos, 2 apresentaram-se monomórficos tanto para a população adulta como para as famílias (Pgi-1 e 6pgdh-1). O loco Mdh-1 também apresentou-se invariável para a população adulta (Tabela 3).

Os parâmetros estimados a partir das freqüências alélicas para avaliar a variabilidade genética tanto da população adulta como das famílias são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Variabilidade genética de uma população natural de *Cedrela fissilis* com base em 13 locos e sete sistemas enzimáticos (os números entre parênteses referem-se aos desvios padrões).

	Adultos	**Famílias**
número médio de alelos por loco	2,31 (0,34)	2,38 (0,26)
número médio de alelos por loco polimórfico	2,70 (0,24)	2,64 (0,28)
porcentagem de locos polimórficos (0,95)	76,9	61,5
porcentagem de locos polimórficos (0,99)	76,9	84,6
heterozigosidade média observada (H_o)	0,222 (0,048)	0,193 (0,049)
heterozigosidade média esperada (H_e)	0,243 (0,050)	0,227 (0,056)
heterozigosidade média observada para os locos polimórficos (H_p)	0,288 (0,055)	0,228 (0,057)
tamanho da amostra	34	150

A verificação dos desvios da panmixia, na população estudada, é apresentada na Tabela 5 através do teste de qui-quadrado para as espectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para cada loco polimórfico Nas árvores adultas os valores de qui-quadrado não foram sigmificativos, com exceção de Mdh-3. Para as famílias, todavia, os locos 6pgdh-2, Idh, Po-1 e Po-2 apresentaram valores significativos.

Tabela 5. Qui-quadrado (χ^2) para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando o número observado (N_o) e esperado (N_e) dos genótipos agrupados em três classes para os 11 locos polimórficos, em uma população natural de *Cedrela fissilis*.

		Adultos			Famílias		
Locos	**Classes**	N_o	N_e	x^2	N_o	N_e	x^2
6pgdh-2	1	99	24,735		102	105,840	
	2	10	8,529		48	40,320	
	3	0	0,735	0,188^{ns}	0	3,840	4,289*
Pgi-2	1	16	16,243		108	107,527	
	2	15	14,515		38	38,947	
	3	3	3,243	0,000^{ns}	4	3,527	0,005^{ns}
G2dh	1	29	29,184		130	127,882	
	2	5	4,632		17	21,237	
	3	0	0,184	0,000^{ns}	3	0,882	3,648^{ns}
Idh	1	22	22,243		92	79,935	
	2	11	10,515		35	59,130	
	3	1	11,243	0,000^{ns}	23	10,935	23,348**
Lap	1	30	30,118		140	140,167	
	2	4	3,765		10	9,667	
	3	0	0,118	0,000^{ns}	0	0,167	0,000^{ns}
Mdh-1	1				145	145,042	
	2				5	4,917	
	3				0	0,042	0,000^{ns}
Mdh-2	1	20	19,125		59	55,207	
	2	11	12,750		64	71,587	
	3	3	2,125	0,196^{ns}	27	23,207	1,365^{ns}
Mdh-3	1	29	27,360		146	146,027	
	2	3	6,279		4	3,947	
	3	2	0,360	4,883*	0	0,027	0,000^{ns}
Mdh-4	1	14	14,235		54	57,660	
	2	16	15,529		78	70,680	
	3	4	4,235	0,000^{ns}	18	21,660	1,292^{ns}
Po-1	1	20	18,382		117	110,940	
	2	10	13,235		24	36,120	
	3	4	2,382	1,158^{ns}	9	2,940	14,523**
Po-2	1	20	19,125		74	56,427	
	2	11	12,750		36	71,147	
	3	3	2,125	0,196^{ns}	40	22,427	35,036**

1 - número de homozigotos para o alelo mais comum

2 - número de heterozigotos entre o alelo mais comum e os alelos raros

3 - número de homozigotos raros e outros heterozigotos

O resultado do teste para se confirmar a suposição de panmixia (Tabela 6) mostra um valor de x^2 não significativo (GL=20) para as árvores adultas e um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para as famílias (GL=22).

Tabela 6. Combinação de probabilidades do teste de qui-quadrado (teste de Fisher), para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os 11 locos polimórficos.

	Adultos		Famílias	
Locos	**Prob. x^2**	**-2.ln(P)**	**Prob. x^2**	**-2.ln(P)**
6pgdh-2	0,665	0,82	0,038	6,54
Pgi-2	1,000	0,00	0,943	0,12
G2dh	1,000	0,00	0,056	5,76
Idh	1,000	0,00	0,001	13,82
Lap	1,000	0,00	1,000	0,00
Mdh-1			1,000	0,00
Mdh-2	0,938	0,13	0,243	2,83
Mdh-3	0,027	7,22	1,000	0,00
Mdh-4	1,000	0,00	0,256	2,73
Po-1	0,642	0,89	0,001	13,82
Po-2	0,658	0,84	0,001	13,82
Total		$9,89^{ns}$		59,42**

4. Discussão:

A heterozigosidade desta população de *Cedrela fissilis* (0,222 ± 0,048) é relativamente elevada se comparada a outras espécies vegetais. HAMRICK e GODT (1990), em uma revisão de 653 estudos de diversidade genética por isoenzimas com 449 espécies de plantas, encontraram uma diversidade genética média ao nível populacional de 0,160 para gimnospermas, 0,149 para espécies arbóreas, 0,159 para espécies de ampla distribuição, 0,109 para espécies tropicais, 0,124 para espécies de polinização por animais e

0,123 para espécies com dispersão pelo vento. Pode-se observar que a diversidade genética desta população de *Cedrela fissilis* é superior às médias de todos estes casos.

No entanto, outros dados de diversidade genética em espécies arbóreas tropicais já indicam valores mais próximos ao encontrado. PAIVA et al. (1994) encontraram um valor de 0,241 para a heterozigosiade média por população em *Hevea brasiliensis*. Para *Bertholletia excelsa*, o mesmo parâmetro apresentou o valor de 0,190 (BUCKLEY et al., 1988). LOVELESS e HAMRICK (1987), em um estudo com 8 espécies arbóreas da Ilha de de Barro Colorado - Panama, encontraram um valor médio de 0,240. Em *Myracrodruon urundeuva*, MORAES (1992) encontrou o valor de 0,150 para este mesmo parâmetro.

No entanto, valores mais elevados ocorrem em algumas espécies. Em *Bauhinia forficata*, SANTOS (1994) encontrou o valor de 0,451 para a heterozigosidade em uma população natural. Já, MURAWSKI e BAWA (1994) encontraram em *Stemonoporus oblongifolius*, uma heterozigosidade média por população de 0,282.

HAMRICK e MURAWSKI (1991) conduziram um estudo com 16 espécies arbóreas tropicais que ocorrem a baixa densidade (de 1 indivíduo a cada 2 ha a 1 indivíduo a cada 10 ha) e obtiveram uma heterozigosidade média de 0,124, bem abaixo da encontrada para *Cedrela fissilis*, que nesta área apresenta uma densidade de 1 indivíduo a cada 7,9 ha. No entanto, duas espécies tiveram valores mais elevados (*Inga minutala* H=0,240) e *Myrospermum fructescens* H=0,257). Os valores baixos, obtidos neste estudo, podem estar relacionados com o número pequeno de indivíduos amostrados (6 a 22 indivíduos por espécie), resultando em uma má amostragem de alelos e genótipos.

Já em outro estudo, HAMRICK e LOVELESS (1989) encontraram para 16 espécies arbóreas tropicais, que ocorrem com alta densidade, uma heterozigosidade média de 0,211, equivalente à encontrada para *Cedrela fissilis*.

HAMRICK e MURAWSKI (1991) compararam a heterozigosidade média das 16 espécies arbóreas raras com as 16 comuns e observaram valores significativamente maiores para as comuns. Estes autores consideraram que baixos níveis de diversidade genética encontrados para as espécies raras devem estar relacionados com tamanhos populacionais efetivos pequenos nestas espécies. Os mesmos autores enfatizam esta afirmação pelo fato

das 16 espécies mais raras apresentarem porcentagem de locos polimórficos (42 %) e número médio de alelos por loco polimórfico (2,14) menores do que o encontrado para as espécies mais comuns (61 % e 3,17 respectivamente). *Cedrela fissilis* apresentou valores novamente semelhantes às espécies mais comuns (77 % e 2,7, respectivamente).

A única outra espécie de Meliaceae estudada quanto à diversidade genética por isoenzimas é *Carapa guianensis* (HALL et al., 1994), que pode ocorrer a alta densidade (até 15 indivíduos reprodutivos por hectare). Neste estudo os autores encontraram uma heterozigosidade média de 0,120 para todos os locos e de 0,310 para os locos polimórficos.

A população de *Cedrela fissilis* encontra-se em panmixia (Tabela 6) o que leva a crer que os cruzamentos ocorrem livremente na mesma, apesar das grandes distâncias entre indivíduos (distância média entre indivíduos adultos de cerca de 280 m). Dessa forma, populações de espécies raras, apesar das dificuldades relacionadas à polinização a grandes distâncias, podem apresentar cruzamentos ao acaso, requisito básico para estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Já para as 5 famílias o desvio da panmixia é significativo, presumindo-se que neste evento reprodutivo deve estar havendo um certo nível de endogamia. Este fato pode estar relacionado com a possibilidade de que as 5 árvores matrizes apresentem uma certa proporção de auto-fecundação ou cruzamento com indivíduos aparentados.

Capítulo III

Sistema Reprodutivo e Taxa de Cruzamento em uma População natural de *Cedrela fissilis* Vell.

1. Introdução:

O sistema reprodutivo é um dos fatores mais importantes para a formação da estrutura genética de populações, contribuindo para a determinação da distribuição da variabilidade genética dentro da progênie de um indivíduo, entre indivíduos de uma população e entre subdivisões de uma população (HAMRICK, 1982). O sistema reprodutivo de espécies hermafroditas, em particular, é determinado tanto por fatores genéticos (grau de auto compatibilidade) como fatores ecológicos (hábito do polinizador, fenologia floral, densidade da população) (MURAWSKI e HAMRICK, 1991).

O estudo do sistema reprodutivo de várias espécies vegetais tem sido feito através da biologia floral e ecologia da polinização e também através da estimativa da taxa de cruzamento, utilizando-se principalmente marcadores isoenzimáticos. Estas estimativas têm sido obtidas a partir do método dos momentos, computando-se os coeficientes de endogamia (f) e relacionando-os com a taxa de cruzamento aparente (t_a) (WEIR, 1990; VENCOVSKY, 1992), ou através de estimativas de máxima verossimilhança (RITLAND e JAIN, 1981; RITLAND e EL-KASSABY, 1985).

Diversas populações naturais de espécies arbóreas tropicais foram estudadas quanto ao sistema reprodutivo, principalmente através de estimativas multiloco (O'MALLEY e BAWA, 1987; O'MALLEY et al., 1988; MURAWSKI et al., 1990; MURAWSKI e

HAMRICK, 1991, 1992a e 1992b; MURAWSKI et al., 1994; MURAWSKI e BAWA, 1994; HALL et al., 1994). Em alguns destes estudos tem se verificado uma considerável variação nos sistemas reprodutivos das espécies, tanto entre anos diferentes, como entre diferentes populações (MURAWSKI et al., 1990; MURAWSKI et al., 1994; MURAWSKI e BAWA, 1994; MURAWSKI e HAMRICK, 1991; HALL et al., 1994). Para as espécies já estudadas, o sistema reprodutivo varia desde um sistema de cruzamento misto até a alogamia completa.

A taxa de cruzamento em espécies hermafroditas depende de fatores como: presença e intensidade de mecanismos de auto-incompatibilidade, dicogamia, comportamento de forrageamento de polinizadores dentro e entre plantas e aborto seletivo de frutos ou sementes autofecundadas (MURAWSKI e HAMRICK, 1991). Também a densidade de plantas florescendo deve ser um determinante do hábito de forrageamento do polinizador e, portanto, deve ter consequências importantes na estrutura de cruzamento de uma população (LEVIN e KERSTER, 1974). Alguns trabalhos têm procurado relacionar a baixa densidade de indivíduos reprodutivos com uma maior probabilidade de autofecundação e maior heterogeneidade na frequência alélica do pólen (MURAWSKI et al., 1990; MURAWSKI e HAMRICK, 1991 e 1992a; HALL et al., 1994).

Em espécies raras, devido à grande distância entre indivíduos reprodutivos e flutuações populacionais, o sistema reprodutivo deve apresentar a possibilidade de auto-fecundação. Assim, a taxa de cruzamento nessas espécies não deve ser muito elevada ou deve apresentar considerável variação entre indivíduos e entre anos com intensidades de floração diferentes.

Este trabalho tem por objetivo:

i) determinar a taxa de cruzamento em uma população de *Cedrela fissilis*;

ii) estudar a taxa de endogamia e a ocorrência de cruzamentos ao acaso entre os indivíduos da população.

2. Metodologia:

2.1. Taxa de Cruzamento:

Para a obtenção da estimativa da taxa de cruzamento foram utilizados duas metodologias, ambas a partir de marcadores isoenzimáticos. A primeira utilizando-se o método dos momentos através dos valores de coeficientes de endogamia (f) e sua relação com a taxa de cruzamento aparente (t_a) (WEIR, 1990; VENCOVSKY, 1992) e a segunda através de estimativas de máxima verossimilhança (RITLAND e JAIN, 1981; RITLAND e EL-KASSABY, 1985).

Os dados necessários para a determinação das taxas de cruzamento foram obtidos a partir de análises eletroforéticas de uma amostra de uma população natural de *Cedrela fissilis*. Foram analisados 34 indivíduos adultos e 5 famílias obtidas a partir de sementes coletadas de 5 desses indivíduos e constituídas cada uma por 30 plantas conforme descrito no Capítulo II.

A taxa aparente de fertilização cruzada pode ser obtida através da estimativa do coeficiente de endogamia (f) calculado a partir da frequência esperada (H_e) e observada (H_o) de heterozigotos, utilizando-se a seguinte equação:

$$f = \frac{(H_e - H_o)}{H_e}$$

de acordo com WRIGHT (1922) e WEIR (1990), sendo:

$H_e = 1 - \Sigma p_u^2$, onde p_u^2 é a freqüência esperada de homozigotos do alelo u,

$H_o = 1 - \Sigma p_{uu}$, onde p_{uu} é a freqüência observada de homozigotos do alelo u.

A taxa de cruzamento foi obtida a partir da expressão (WEIR, 1990):

$$t_a = \frac{(1-f)}{(1+f)}$$

O segundo método utilizou do modelo de cruzamento misto de RITLAND e JAIN (1981). Através deste método foram obtidas as taxas de cruzamento multiloco da população (t_m), as taxas de cruzamento dos locos individuais (t_s) e as frequências alélicas do pólen e dos óvulos.

O modelo de RITLAND e JAIN é baseado nas seguintes suposições: i) todos os genótipos maternos cruzam na mesma taxa com um conjunto homogêneo de pólen; ii) alelos em locos diferentes segregam independentemente; iii) cada loco está em equilíbrio de Hardy-Weinberg; e iv) os marcadores genéticos não são afetados por seleção ou mutação entre o acasalamento e a análise.

Para a obtenção das estimativas foi utilizado o programa "Multilocus", desenvolvido por RITLAND (1990). O programa utiliza o qui-quadrado para testar desvios significativos das frequências genotípicas em relação às espectativas do modelo. O método de "bootstrap" foi utilizado para calcular o erro padrão da estimativa de t_m, sendo utilizados 1000 reamostragens.

2.2. Ocorrência de Cruzamentos ao Acaso:

Para se averiguar se os cruzamentos ocorrem ao acaso, as diferenças entre as freqüências alélicas no pólen, óvulo e indivíduos adultos foram testadas, utilizando-se a distribuição estatística qui-quadrado, conforme MURAWSKI e HAMRICK (1992a), da seguinte maneira:

$$x^2 = N \times F_{st} \times (a-1);\ GL = (a-1)$$

sendo:

N = número total de gametas das populações comparadas (pólen e óvulos, pólen e indivíduos adultos ou óvulos e indivíduos adultos)

F_{st} = divergência genética entre populações (pólen, óvulos e indivíduos adultos são tratados como populações distintas)

a = número de alelos por loco

Também foi quantificada a ocorrência de diversidade genética entre as freqüências alélicas do pólen que contribui para a formação das sementes de cada matriz. Tratando cada família como uma subpopulação, o índice F_{st} de Wright foi calculado para cada loco, conforme MURAWSKI e HAMRICK (1991):

$$F_{st}(P) = 1 - \frac{\overline{2pq}}{2\overline{pq}}$$

sendo:

p = freqüência do alelo mais comum;

q = 1-p.

2.3. Distância de Fluxo de Pólen:

Estimativas de distância de fluxo de pólen proveniente de fora da área levantada foram obtidas através da ocorrência de dois alelos exclusivos às progênies, ou seja, alelos que não ocorreram nos indivíduos adultos, mas que foram detectados nas progênies. A estimativa da distância mínima de caminhamento do pólen foi realizada através do cálculo da distância das árvores matrizes até a borda mais próxima da área de estudo. Para este

cálculo, não foi considerada a borda sul da área de estudo, pois esta é a divisa da reserva e a propriedade vizinha não apresenta cobertura florestal.

3. Resultados:

Com a finalidade de se obter a estimativa da taxa de cruzamento multiloco (t_m) foi realizado um teste de qui-quadrado para testar a adequação dos dados às pressuposições do modelo (RITLAND e JAIN, 1981). Os locos 6pgdh-2, Idh, Mdh-3 e Po-2 apresentaram valores de qui-quadrado significativos, não se adequando ao modelo e, portanto, sendo excluídos da análise. Com a exclusão dos 4 locos significativos, a taxa de cruzamento multiloco (t_m) encontrada foi de 0,92 ± 0,05 (Tabela 1). As taxas de cruzamento multiloco para cada família, variaram entre 0,62 e 1,08 (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativas da taxa da cruzamento multiloco (t_m) para as cinco famílias e para cada família, freqüência alélica estimada no pólen e nos óvulos e valor de qui-quadrado para a adequação ao modelo de cruzamento misto, em uma população natural de *Cedrela fissilis*.

Loco	Alelo	Freq. Alélica Estimada		t (±EP)	x^2
		Pólen	Óvulo		
Pgi-2	1	0,810	0,800		
	2	0,116	0,000		
	3*	0,074	0,200		$10,29^{ns}$
G2dh	1	0,923	0,900		
	2	0,077	0,100		$2,96^{ns}$
Lap	1	0,920	1,000		
	2	0,065	0,000		
	3	0,014	0,000		$0,00^{ns}$
Mdh-1	1	0,964	1,000		
	2	0,036	0,000		$0,00^{ns}$
Mdh-2	1	0,668	0,500		
	2	0,294	0,400		
	3	0,038	0,100		$13,53^{ns}$
Mdh-4	1	0,462	0,300		
	2	0,538	0,700		$2,20^{ns}$
Po-1	1	0,819	0,900		
	2	0,144	0,100		
	3	0,036	0,000		$4,97^{ns}$
Família 1				1,00 (0,12)	
Família 2				0,94 (0,13)	
Família 3				0,86 (0,07)	
Família 4				0,62 (0,07)	
Família 5				1,08 (0,11)	
Multiloco				0,92 (0,05)	

* No alelo 3 estão também somadas as frequências dos alelos 4 e 5.

A estimativa da taxa de cruzamento para cada loco bem como a sua média (t_s) também foi calculada (Tabela 2). A média das taxas de cruzamento para cada loco (t_s), excluindo-se o loco Po-2, que não se adequou ao modelo, foi de 0,83 ± 0,13, inferior à t_m, mas sem diferir desta significativamente (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativa da taxa da cruzamento em cada loco (t_s) e média dos locos não significativos, freqüência alélica estimada no pólen e nos óvulos e valor de qui-quadrado para a adequação ao modelo de cruzamento, em uma população de *Cedrela fissilis*.

Loco	Alelo	Freq. Gênica Estimada		t (±EP)	GL	x^2
		Pólen	Óvulo			
6pgdh-2	1	0,947	0,700			
	2	0,053	0,300	1,99 (0,13)	1	5,02 ^{ns}
Pgi-2	1	0,813	0,800			
	2	0,115	0,000			
	3	0,072	0,200	1,12 (0,10)	9	7,94 ^{ns}
G2dh	1	0,929	0,900			
	2	0,071	0,100	0,82 (0,18)	1	3,08 ^{ns}
Idh	1	0,739	0,700			
	2	0,241	0,200			
	3	0,020	0,100	0,74 (0,11)	9	7,10 ^{ns}
Lap	1	0,842	1,000			
	2	0,129	0,000			
	3	0,029	0,000	0,47 (0,21)	9	0,00 ^{ns}
Mdh-1	1	0,869	1,000			
	2	0,131	0,000	0,25 (0,16)	1	0,00 ^{ns}
Mdh-2	1	0,711	0,500			
	2	0,288	0,400			
	3	0,001	0,100	0,70 (0,10)	9	18,56 ^{ns}
Mdh-4	1	0,462	0,300			
	2	0,538	0,700	0,92 (0,12)	1	2,18 ^{ns}
Po-1	1	0,689	0,900			
	2	0,229	0,100			
	3	0,082	0,000	0,40 (0,11)	9	7,06 ^{ns}
Po-2	1	0,676	0,600			
	2	0,324	0,400	0,51 (0,09)	1	13,32 *
Média				0,83 (0,13)		

Dos sete locos utilizados para a análise de t_m, 5 apresentaram diferenças estatísticas entre as freqüências alélicas do pólen e dos óvulos (Tabela 3). Esta diferença pode ser resultante de uma amostragem não representativa de árvores matrizes (óvulos), já que foram utilizadas 5 matrizes dentre os 34 indivíduos adultos. Esta suposição é confirmada quando se comparam as freqüências alélicas dos óvulos com as das plantas adultas e observa-se que,

para os sete locos analisados, 5 diferem estatisticamente. No entanto, as freqüências alélicas do pólen e das árvores adultas não diferem estatisticamente, levando a crer que o pólen recebido pelas 5 árvores matrizes é representativo da população de árvores adultas como um todo. Portanto, o pólen que contribuiu para a formação das sementes das cinco famílias deve ser uma amostra proveniente de toda a população de árvores adultas.

Tabela 3. F_{st} e qui-quadrado para as diferenças das freqüências alélicas do pólen e dos óvulos (O/P), dos óvulos e das árvores adultas (O/A), e do pólen e das árvores adultas (P/A) e divergência entre as freqüências alélicas do pólen recebido pelas cinco matrizes ($F_{st}(P)$) em uma população natural de *Cedrela fissilis*.

	O/P		O/A		P/A		$F_{st}(P)$
Loco	F_{st}	x^2	F_{st}	x^2	F_{st}	x^2	
Pgi-2	0,022	13,38 **	0,013	4,60 ^{ns}	0,014	4,99 ^{ns}	0,027
G2dh	0,002	0,49 ^{ns}	0,002	0,39 ^{ns}	0,000	0,00 ^{ns}	0,024
Lap	0,038	21,27 **	0,030	11,19 **	0,001	0,48 ^{ns}	0,086
Mdh-1	0,018	5,50 *	0,000	0,00 ^{ns}	0,018	3,37 ^{ns}	0,056
Mdh-2	0,020	12,17 **	0,048	17,65 **	0,006	2,31 ^{ns}	0,184
Mdh-4	0,028	8,35 **	0,003	0,59 ^{ns}	0,012	2,26 ^{ns}	0,015
Po-1	0,010	5,99 ^{ns}	0,041	15,27 **	0,013	4,84 ^{ns}	0,136
Média							0,075

As freqüências alélicas do pólen que contribuiu para a formação das sementes de cada matriz variou pouco entre árvores nos locos analisados, como pode ser observado pelos valores baixos de $F_{st}(P)$ (Tabela 3).

Para a obtenção da taxa de cruzamento aparente (t_a), utilizando-se do coeficiente de endogamia (f), foram utilizados os mesmos locos empregados no cálculo da taxa de cruzamento multilocos. Os valores dos coeficientes de endogamia são apresentados na Tabela 4, tanto para as famílias como para as plantas adultas. O valor médio da taxa de cruzamento aparente (t_a) estimado a partir do coeficiente de endogamia foi de 0,85.

Tabela 4. Estimativas dos coeficientes de endogamia (f) nos adultos e nas 5 famílias e da taxa de cruzamento para 7 locos isoenzimáticos em uma população natural de *Cedrela fissilis*.

Loco	Famílias	Adultos
Pgi-2	-0,021	0,033
G2dh	0,199	-0,079
Lap	-0,029	-0,063
Mdh-1	-0,017	
Mdh-2	0,130	0,076
Mdh-4	-0,104	-0,030
Po-1	0,347	0,258
Média	0,099	0,033
Taxa de cruzamento (t_a)	0,85	

Dentre os 32 alelos encontrados, dois deles somente ocorreram nas famílias. O alelo 2 do loco Mdh-1 somente ocorreu em dois indivíduos na família 1 e em dois indivíduos da família 2. O alelo 3 do loco Lap ocorreu nas famílias 1, 3 e 4 em um indivíduo em cada uma. Com estes dados, pode-se estimar uma distância mínima possível de caminhamento do pólen através da distância das árvores matrizes até a borda mais próxima da área de estudo. Esta distância pode chegar a até cerca de 950 m, no caso da matriz número 2. Para a matriz número 1 a distância até a borda mais próxima é 500 m, para a matriz 3 é 400 m e para a matriz 4 é 200 m.

4. Discussão:

A alta taxa de cruzamento (t_m = 0,92) encontrada para *Cedrela fissilis* é comparável com estimativas feitas para outras espécies arbóreas de florestas neotropicais (Tabela 5). A maioria das espécies já estudadas apresenta taxas de cruzamento ao redor ou acima de 0,9.

A exceção é feita para as duas espécies de Bombacaceae (*Cavanillesia platanifolia* e *Ceiba pentandra*), que apresentaram um sistema de cruzamento misto (Tabela 5).

Os dados utilizados para o cálculo da taxa de cruzamento multiloco não obedecem a todos os pressupostos do modelo de cruzamento misto. As freqüências alélicas do pólen diferem das dos óvulos em 5 dos 7 locos analisados (Tabela 3). No entanto, segundo RITLAND (1983), estes desvios do modelo afetam pouco o valor final da estimativa da taxa de cruzamento multiloco.

A inexistência de diferenças estatísticas entre as freqüências alélicas do pólen e das árvores adultas (Tabela 3) indica que o pólen recebido pelas árvores matrizes é representativo da população de árvores adultas amostradas, fazendo supor que o fluxo de pólen dentro da população é bastante amplo. MURAWSKI e HAMRICK (1991), estudando a relação entre a densidade de indivíduos de 9 espécies arbóreas com suas taxas de cruzamento e heterogeneidade do pólen, sugerem que árvores de populações que apresentem baixa densidade de indivíduos adultos tendem a receber o pólen de poucas árvores em relação a árvores em populações com alta densidade.

A densidade de indivíduos adultos na população de *Cedrela fissilis* é semelhante à densidade encontrada nas espécies mais raras deste mesmo trabalho (Tabela 5), que também fornece o grau de variação das freqüências alélicas do pólen recebido por cada matriz ($F_{st}(P)$). Pode-se notar que as espécies mais raras tiveram de modo geral um $F_{st}(P)$ maior (Tabela 5), concluindo os autores, que estas tiveram uma maior heterogeneidade entre o pólen recebido em cada matriz, ou seja, estas espécies não se cruzam aleatoriamente, mas sim, com uma sub-amostra do pólen disponível de algumas árvores. Para a população de *Cedrela fissilis*, o $F_{st}(P)$ médio encontrado é de 0,075 (Tabela 3). Este valor é bastante baixo se comparado com as mesmas espécies, indicando que as freqüências alélicas do pólen recebido por cada árvore de *Cedrela fissilis* é relativamente constante, levando a crer que os cruzamento ocorrem ao acaso.

Tabela 5. Estimativas de taxas de cruzamento multiloco em populações de espécies arbóreas neotropicais, local de estudo, densidade de indivíduos reprodutivos e variação entre famílias das freqüências alélicas do pólen recebido por cada árvore (F_{st}(P) média para todos os locos).

Espécie	Família	Local	t_m (±EP)	densidade	refer.	F_{st}(P)
Astrocarium mexicanum	Arecaceae	México, Los Tuxtlas	0,933		1	
Cavanillesia platanifolia	Bombacaceae	Panamá, IBC	0,213 (0,052) 0,347 (0,025) 0,569 (0,024)	0,10 0,08 0,18	2,3	0,259 0,227 0,151
		Panamá, Darien	0,661 (0,074)		4	
Quararibea asterolepis		Panamá, IBC	1,008 (0,010)	2,00	2, 3	0,098
Ceiba pentandra		Panamá, IBC	0,689 (0,030)	0,24	3, 5	0,151
Cordia alliodora	Boraginaceae	Costa Rica, La Selva	0,966 (0,027)		6	
Pithecellobium pedicellare	Fabaceae	Costa Rica, La Selva (3 locais)	0,951 (0,021) 0,970 (0,028) 0,986 (0,014)		7, 8	
Platypodium elegans		Panamá, IBC	0,924 (0,043) 0,898 (0,043)	0,34 0,50	3	0,163 0,083
Tachigali versicolor		Panamá, IBC	0,937 (0,044)	0,10	3	0,108
Bauhinia forficata	Caesalpiniaceae	Brasil, Piracicaba	0,982 (0,034)		9	
Beilschmedia pendula	Lauraceae	Panamá, IBC	0,918 (0,058)	2,10	3	0,064
Bertholletia excelsa	Lecythidaceae	Brasil, Acre	0,849 (0,033)		10	
Carapa guianensis	Meliaceae	Costa Rica (2 locais)	0,967 (0,022) 0,986 (0,028)		11	
Trichilia tuberculata		Panamá, IBC	1,077 (0,028)	6,00	3	0,082

continua

Tabela 5. Continuação.

Espécie	Família	Local	t_m (±EP)	densidade	refer.	F_{st}(P)
Brosimum alicastrum	Moraceae	Panamá, IBC	0,875 (0,035)	0,30	3	0,170
Sorocea affinis		Panamá, IBC (2 locais)	1,089 (0,045) 0,969 (0,020)	3,56 6,51	3	0,104 0,083
Psychotria faxucens	Rubiaceae	México, Los Tuxtlas	0,995 (0,086) 1,015 (0,061)		12	
Cecropia obtusifolia	Cecropiaceae	México, Los Tuxtlas	0,974 (0,024)		13	

Densidade em árvores em floração por hectare (referência 3)
1 - EGUIARTE et al., 1992
2 - MURAWSKI et al., 1990
3 - MURAWSKI e HAMRICK, 1991
4 - MURAWSKI e HAMRICK, 1992a
5 - MURAWSKI e HAMRICK, 1992b
6 - BOSHIER, 1995
7 - O'MALLEY e BAWA, 1987
8 - HALL et al., 1994
9 - SANTOS, 1994
10 - O'MALLEY et al., 1988
11 - HALL et al.,1994
12 - PEREZ-NASSER et al., 1993
13 - ALVAREZ-BUYLLA e GARAY, 1994

Outro dado que reforça a existência de amplo fluxo de pólen é o fato de ocorrerem 2 alelos exclusivos às progênies, indicando que o pólen pode atingir distâncias consideráveis (cerca de 1000 m). HAMRICK e MURAWSKI (1990), através de uma análise de exclusão de paternidade, encontraram em *Platypodium elegans* uma distância média de movimento de pólen de cerca de 400 m, sendo que movimentos acima de 750 m foram relativamente comuns. Os autores indicam que, apesar de uma alta proporção da polinização ocorrer entre os vizinhos mais próximos, o movimento de pólen é extenso.

A diferença entre a taxa de cruzamento multiloco ($t_m = 0,92 \pm 0,05$) e a taxa média de cruzamento de locos individuais ($t_s = 0,83 \pm 0,13$) não foi significativa. Segundo RITLAND (1990), quando $t_m - t_s$ apresenta uma diferença positiva, isto indica a ocorrência

de endogamia decorrente do cruzamento entre indivíduos aparentados. A taxa de cruzamento aparente (t_a = 0,85) também apresentou-se mais baixa que t_m, e apesar da mesma ser calculada por uma metodologia diferente, pode-se compará-la da mesma forma com a taxa de cruzamento multiloco, obtendo-se resultado semelhante à comparação com t_s.

A endogamia encontrada nos adultos (0,033) apresentou-se inferior à metade da encontrada nas famílias (0,099). Em várias espécies arbóreas tropicais já estudadas, este fato também pôde ser observado (Tabela 6). A maior heterozigosidade presente nos adultos em relação às suas progênies sugere que deva ocorrer uma desvantagem dos homozigotos durante o recrutamento. HAMRICK et al. (1993), estudando três espécies arbóreas do Panamá, encontrou um excesso de heterozigotos em classes de diâmetro maiores, o que condiz com a suposição. ALVAREZ-BUYLLA e GARAY (1994), também observaram em populações naturais de *Cecropia obtusifolia*, que a heterozigosidade média aumentou significativamente desde as sementes até os indivíduos adultos, passando por valores intermediários em plântulas e indivíduos jovens.

Tabela 6. Índices de fixação (F) em adultos e suas progênies em várias espécies arbóreas tropicais.

Espécie		$F_{adultos}$	$F_{progênies}$	Referência
Astrocaryum mexicanum		-0,41	-0,19	EGUIARTE et al., 1992
Cavanillesia platanifolia	1987	-0,198	0,275	MURAWSKI et al., 1990
	1988	-0,198	0,475	
	1989	-0,198	0,649	
Quararibea asterolepis		-0,046	0,000	
Shorea congestiflora		0,088	0,067	MURAWSKI et al., 1994a
Shorea trapezifolia	1990	-0,06	0,295	
	1991	-0,30	0,237	
Stemonoporus oblongifolius		-0,101	0,085	MURAWSKI e BAWA, 1994
Psychotria faxucens		0,075	0,128	PEREZ-NASSER et al., 1993

As taxas de cruzamento para cada matriz variaram significativamente de 0,62 ± 0,07 até 1,08 ± 0,11, mostrando que pode haver diferenças individuais no sistema reprodutivo. Estas variações devem estar relacionadas com características genéticas, pois não existem

evidências de que diferenças fenológicas ou isolamento espacial tenham ocorrido (a matriz número 4 que apresentou a menor taxa de cruzamento não está isolada e floresceu concomitantemente com as demais árvores). MURAWSKI e HAMRICK (1992) encontraram variações muito grandes nas taxas de cruzamento individuais de árvores de *Ceiba pentandra*, que variaram desde a autofecundação até a alogamia completa. A taxa de cruzamento próxima de zero esteve relacionada com o isolamento espacial e fenologia de floração discrepante do restante da população.

Em espécies raras um sistema de cruzamento mais flexível deve ser interessante, pois nestas espécies deve ser mais comum a ocorrência eventual de indivíduos isolados do restante da população. Neste caso, mesmo isolados, indivíduos com a capacidade de se autofecundarem teriam a chance de se reproduzir.

Ainda restam muitas dúvidas sobre o sistema reprodutivo de espécies raras, principalmente no que se refere a como ocorre o caminhamento do pólen a distâncias tão grandes, em especial em espécies que apresentam flores pequenas e pouco atrativas como *Cedrela fissilis*. Estudos de ecologia da polinização nestas espécies são fundamentais para a elucidação destas questões.

Capítulo IV

Estrutura Genética Espacial em uma População Natural de *Cedrela fissilis* Vell.

1. Introdução:

A maior parte da diversidade genética na maioria das espécies arbóreas é constituída da variação genética dentro de populações (HAMRICK et al., 1981). A distribuição desta variação genética intrapopulacional reflete, ao menos em parte, a ação de processos genéticos ao nível populacional, isto é, seleção e deriva genética (YOUNG et al., 1993). Estes processos, ou seja, a seleção em microhabitats e deriva genética devido ao fluxo gênico restrito, têm sido citados como causas da distribuição não aleatória de genótipos em populações naturais (WRIGHT, 1946; SOKAL et al., 1989; EPPERSON, 1990 a, b; LOVELESS e HAMRICK, 1984).

Para genótipos seletivamente neutros, a estrutura formada devido ao isolamento pela distância já foi bem caracterizada (WRIGHT, 1943). Neste caso, o cruzamento entre indivíduos próximos resulta em endogamia e variação espacial nas freqüências alélicas.

A seleção em microhabitats também é responsável pela criação de padrões genéticos espaciais, que podem ser bastante abruptos (HAMRICK e ALLARD, 1972). Este caso é particularmente importante em ambientes que variam pronunciadamente.

O padrão de deposição de sementes, a dispersão de pólen, a densidade de indivíduos adultos, a seleção em microhabitats e aspectos relativos ao recrutamento são citados como

fatores que afetam a estrutura genética espacial dentro de populações (HOWE e SMALLWOOD, 1982; HAMRICK e LOVELESS, 1986). HAMRICK et al. (1993) consideram que espécies com baixa densidade de indivíduos adultos teriam maior heterogeneidade genética espacial resultante da dispersão de sementes, se comparadas com espécies que ocorrem em alta densidade. Este fato ocorreria especialmente em espécies com dispersão de sementes restrita, pois, nestas espécies, os locais onde ocorrem as plântulas filhas de cada árvore adulta apresentariam pequena sobreposição.

Dessa maneira, o conhecimento dos padrões espaciais da variação genética intrapopulacional fornece subsídios básicos para o entendimento de processos evolutivos e ecológicos em populações naturais de plantas.

Por outro lado, a estrutura genética espacial também é importante para o estabelecimento de estratégias de amostragem de populações naturais, tanto para conservação genética como para fins de melhoramento, possibilitando a formação de amostras mais significativas. Deve-se citar também a importância deste conhecimento para minimizar o impacto de práticas de manejo na sustentabilidade dos recursos genéticos.

Para se descrever a estrutura genética, utilizando-se o modelo de isolamento pela distância, pode-se empregar a análise de autocorrelação espacial (SOKAL & ODEN, 1978a). Este método revela a escala espacial na qual a diferenciação genética ocorre em populações naturais (SOKAL e ODEN, 1978b; EPPERSON e CLEGG, 1986; DEWEY e HEYWOOD, 1988). Comparando-se com a Estatística F de Wright, a autocorrelação espacial tem a vantagem de não necessitar o estabelecimento de subpopulações a priori.

Este método testa se um valor de uma variável, observado em um determinado local, é independente dos valores da variável em locais próximos (SOKAL e ODEN, 1978a). Esta técnica de análise tem sido empregada em estudos ecológicos e ambientais (SOKAL e ODEN, 1978b).

Mais recentemente, esta técnica também começou a ser empregada em estudos de variação genética em plantas, a partir de dados gerados por eletroforese de isoenzimas (SOKAL e ODEN, 1978b; SCHNABEL e HAMRICK, 1990; SCHNABEL et al.,1991; DEWEY e HEYWOOD, 1988; PERRY e KNOWLES, 1991).

Em estudos genéticos, a autocorrelação espacial pode ser utilizada tanto para estimar o grau de isolamento de populações a partir das freqüências gênicas ou fenotípicas em cada população, como ao nível intrapopulacional, onde esta técnica pode auxiliar na detecção de agrupamentos de indivíduos aparentados. Neste caso, é feita uma análise por alelo, utilizando-se os genótipos de cada indivíduo e sua localização.

Neste trabalho, a autocorrelação espacial foi empregada para analisar dados isoenzimáticos de uma população natural de *Cedrela fissilis*, com o objetivo de determinar se a distribuição espacial de genótipos é aleatória ou está estruturada.

2. Metodologia:

A análise de Autocorrelação Espacial foi utilizada para investigar a estrutura genética espacial em uma população de *Cedrela fissilis*, utilizando-se para tanto os genótipos individuais dos locos polimórficos de cada árvore adulta. A população estudada está descrita no Capítulo II, onde pode-se observar a distribuição espacial dos indivíduos.

Para tanto, cada alelo foi considerado como uma variável e codificado da seguinte maneira, para cada árvore: 1 para homozigotos, 0,5 para heterozigotos e 0 quando ausente. Na análise, foram utilizados os alelos que ocorreram em pelo menos 6 indivíduos da população, pois os mais raros não proporcionariam nenhuma informação adicional a respeito da estrutura espacial. Para os locos dialélicos, somente um alelo foi analisado, pois o segundo alelo apresenta distribuição dependente do primeiro.

Dessa forma foram analisados 13 alelos, a saber: 6pgdh-2 alelo 1; Pgi-2 alelos 1, 2 e 3; G2dh alelo 1; Idh alelo 1 e 2; Lap alelo 1; Mdh-2 alelo 1; Mdh-3 alelo 1; Mdh-4 alelo 1; Po-1 alelo 1; e Po-2 alelo 1.

A estrutura espacial da variação isoenzimática foi quantificada pelo índice I de Moran (SOKAL e ODEN, 1978a). Este índice quantifica a similaridade genética de pares de indivíduos adjacentes em relação à amostra da população como um todo. O índice I é dado pela fórmula, para um dado alelo:

$$I = \frac{n\sum_{i \neq j} w_{ij}(x_i - \bar{x})(x_j - \bar{x})}{\sum_{i \neq j} w_{ij} \sum_{i} (x_i - \bar{x})^2}$$

sendo:

n - número de indivíduos utilizados na análise,

w_{ij} - pesos utilizados na comparação dos pontos,

x_i - valor dado ao indivíduo i (x_i=1; 0,5 ou 0),

x_j - valor dado ao indivíduo j (x_j=1; 0,5 ou 0),

$\bar{x}$ - valor médio dado aos indivíduos analisados.

O índice I pode assumir valores entre +1 (autocorrelação positiva completa, ou seja, os indivíduos pareados são idênticos) e -1 (autocorrelação negativa completa, ou seja, os indivíduos pareados são completamente diferentes). Na hipótese nula de disposição espacial completamente aleatória (autocorrelação espacial ausente), I é assintoticamente gausseano com um valor esperado próximo a zero (I_e= -1/(n-1)). Testes de significância foram feitos através do desvio padrão normal (SOKAL e ODEN, 1978a).

As comparações entre pares de indivíduos podem ser enfatizadas através de ponderação no cálculo do índice I. Uma ponderação pode ser escolhida para representar uma hipótese particular de estruturação espacial quando comparada com a hipótese nula de não haver estrutura. Neste trabalho foram utilizadas as comparações de vizinho mais próximo, conecção de Gabriel e todas as comparações dentro de uma classe de distância especificada.

Na análise do vizinho mais próximo, é dado o peso w=1 a pares de indivíduos adjacentes e peso 0 a todos os demais pares possíveis (SOKAL e ODEN, 1978a). Segundo DEWEY e HEYWOOD (1988), geralmente este é o teste mais rigoroso para se detectar a presença de estrutura espacial.

Já na conecção de Gabriel, dois indivíduos A e B são pareados (recebem peso 1) se nenhum outro indivíduo ocorrer sobre ou dentro do círculo cujo diâmetro é o segmento de reta AB (SOKAL e ODEN, 1978a). Neste tipo de análise, mais indivíduos são pareados com indivíduos circundantes. No caso da conecção de Gabriel, a distância média entre indivíduos analisados é maior se comparado com a análise do vizinho mais próximo.

A terceira forma de ponderação utilizada foi através de todas as comparações dentro de uma classe de distância especificada. Nesta análise, todas as comparações entre pares de indivíduos, cuja distância entre si apresentar uma valor incluído em um intervalo especificado, recebem o peso 1, as demais comparações entre indivíduos recebem o valor 0. Através desta análise, pode-se construir um gráfico comparando-se o índice I obtido para diversas classes de distância em relação às distâncias especificadas. Este gráfico recebe a denominação de correlograma (SOKAL e ODEN, 1978a) e pode dar indicações da extensão da estrutura espacial quando esta ocorre.

Neste estudo, as classes de distância foram especificadas a fim de que cada uma apresentasse um número de conecções mínimo ao redor de 30. Desse modo, foram estabelecidas 10 classes de distância entre indivíduos: 0 a 150, 150 a 300, 300 a 450, 450 a 600, 600 a 750, 750 a 900, 900 a 1050, 1050 a 1350, 1350 a 1950, e 1950 a 3000 m.

As análises de autocorrelação espacial foram feitas utilizando-se o programa "Autocorr" desenvolvido por John S. Heywood.

3. Resultados:

Os resultados relativos aos valores do índice I de Moran para vizinho mais próximo e à conexão de Gabriel são mostrados na Tabela 1. Pode-se observar que não há indicação de formação de estrutura espacial, uma vez que existe igual número de valores positivos e negativos para o índice de Moran. No entanto, os cinco valores que apresentaram-se significativos são positivos, levando-se a crer que pode haver uma leve tendência à formação de estrutura. Porém, este raciocínio deve ser cauteloso, uma vez que somente para 3 alelos dos 13 analisados ocorrerem valores significativos.

Tabela 1. Coeficientes de autocorrelação espacial (índice I de Moran) para dois métodos de pareamento de indivíduos: vizinho mais próximo (I_{vmp}) e conecção de Gabriel (I_g), distância média entre indivíduos pareados e número de comparações em uma população natural de *Cedrela fissilis*.

Loco	Alelo	I_{vmp}	I_g
6pgdh-2	1	0,511**	0,269*
Pgi-2	1	0,117	0,037
	2	-0,089	-0,200
	3	0,504*	0,263*
G2dh	1	0,163	0,061
Idh	1	-0,194	-0,180
	2	-0,125	-0,144
Lap	1	-0,150	0,069
Mdh-2	1	-0,049	-0,107
Mdh-3	1	0,173	-0,020
Mdh-4	1	-0,181	-0,155
Po-1	1	-0,084	-0,139
Po-2	1	0,195	0,266*
distância média (m)		94,0 ± 6,2	164,0 ± 20,1
número de comparações		24	44

Na Tabela 2, pode-se observar os índices I de Moran para as 10 classes de distância e 13 locos analisados. Os valores mostrados sugerem uma flutuação aleatória entre valores positivos e negativos, sendo esta flutuação explicitada nos correlogramas das Figuras 1, 2 e 3.

Dos 130 valores obtidos somente 15 apresentaram-se significativos (11,5 %), sendo que estes também apresentaram flutuações aleatórias nas diversas classes de distância. Somente na menor classe de distância (0 a 150 m) houve tendência de pontos significativos positivos para 4 alelos (6pgdh alelo 1, Pgi-2 alelo 3, G2dh alelo 1, Po-2 alelo 1), apesar dos 9 outros alelos nesta classe não apresentarem valores significativos.

Tabela 2. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficiente I de Moran) para 10 classes de distância e para 13 alelos de 10 locos, distância média entre indivíduos pareados e número de comparações, em uma população natural de *Cedrela fissilis*.

		Classes de distância †									
Loco	**Alelo**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
6pgdh-2	1	0,380**	0.317*	0.006	-0.126	0.139	0.077	-0.325*	0.271	-0.393*	-0.271
Pgi-2	1	0.077	-0.022	-0.016	-0.058	-0.024	-0.133	0.175	0.037	-0.305	-0.033
	2	-0.061	-0.049	-0.065	0.034	0.012	0.021	-0.113	-0.019	-0.162	-0.075
	3	0.307*	-0.080	-0.087	-0.068	-0.042	-0.024	-0.174	-0.007	0.105	-0.170
G2dh	1	0.327**	0.005	0.011	-0.186	-0.019	-0.166	-0.351*	0.357*	-0.037	0.089
Idh	1	-0.120	0.015	-0.165	0.008	0.036	-0.087	0.150	-0.091	0.172	-0.277
	2	-0.116	-0.019	-0.124	0.023	0.068	-0.068	0.027	-0.029	-0.043	-0.146
Lap	1	-0.060	0.005	0.227*	0.000	0.158*	-0.106	-0.132	0.133	-0.029	-0.029
Mdh-2	1	0.037	-0.284*	0.222*	-0.179	-0.089	0.117	0.087	-0.231	0.126	-0.084
Mdh-3	1	0.006	-0.104	0.165	-0.215	-0.029	-0.056	0.095	-0.005	0.020	-0.058
Mdh-4	1	-0.195	-0.026	-0.132	-0.015	0.006	0.037	0.031	-0.135	0.029	0.029
Po-1	1	-0.137	0.042	-0.029	0.010	-0.077	0.073	0.013	-0.213	-0.172	-0.024
Po-2	1	0.387**	0.266*	0.182	-0.049	0.229*	-0.182	-0.287	-0.195	-0.126	0.042
I médio		0.064	-0.044	-0.020	-0.063	-0.007	-0.038	-0.062	-0.010	-0.063	-0.077
distância média (m) (DP)		89 (3,5)	220 (4,4)	371 (4,0)	530 (4,4)	678 (4,7)	822 (4,2)	969 (4,7)	1178 (9,7)	1639 (20,8)	2223 (17,1)
número de comparações		47	66	58	72	92	90	47	33	28	28

*P<0,05; **P<0,01.

†Classes de distância em metros: 1, 0-150; 2, 150-300; 3, 300-450; 4, 450-600; 5, 600-750; 6, 750-900; 7, 900-1050; 8, 1050-1350; 9, 1350-1950; 10, 1950-3000.

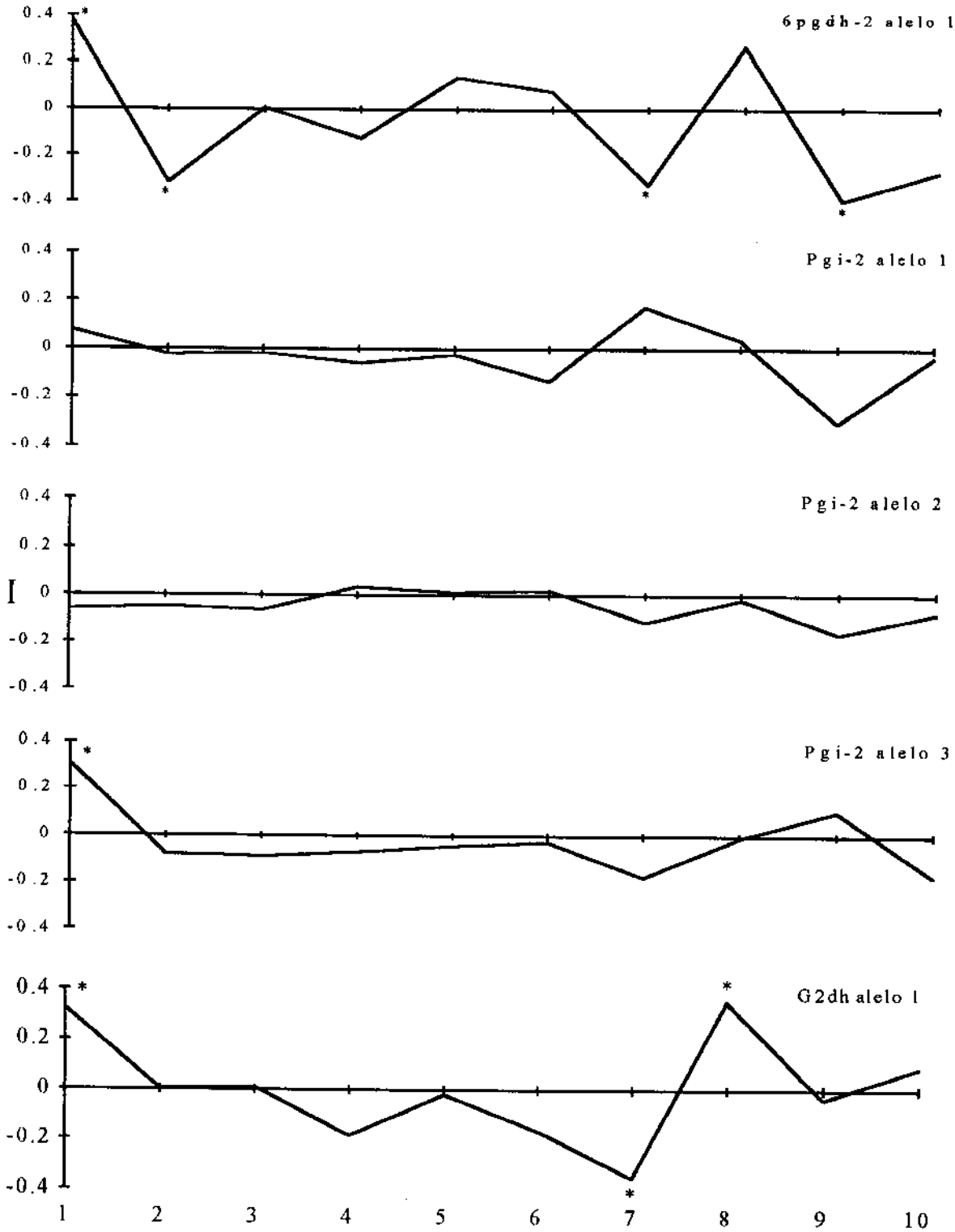


Figura 1. Correlogramas para os alelos 6pgdh-2 alelo1, Pgi-2 alelos 1, 2 e 3 e G2dh alelo 1 para 10 classes de distância (* indica pontos com autocorrelação significativa) em uma população natural de *Cedrela fissilis*.

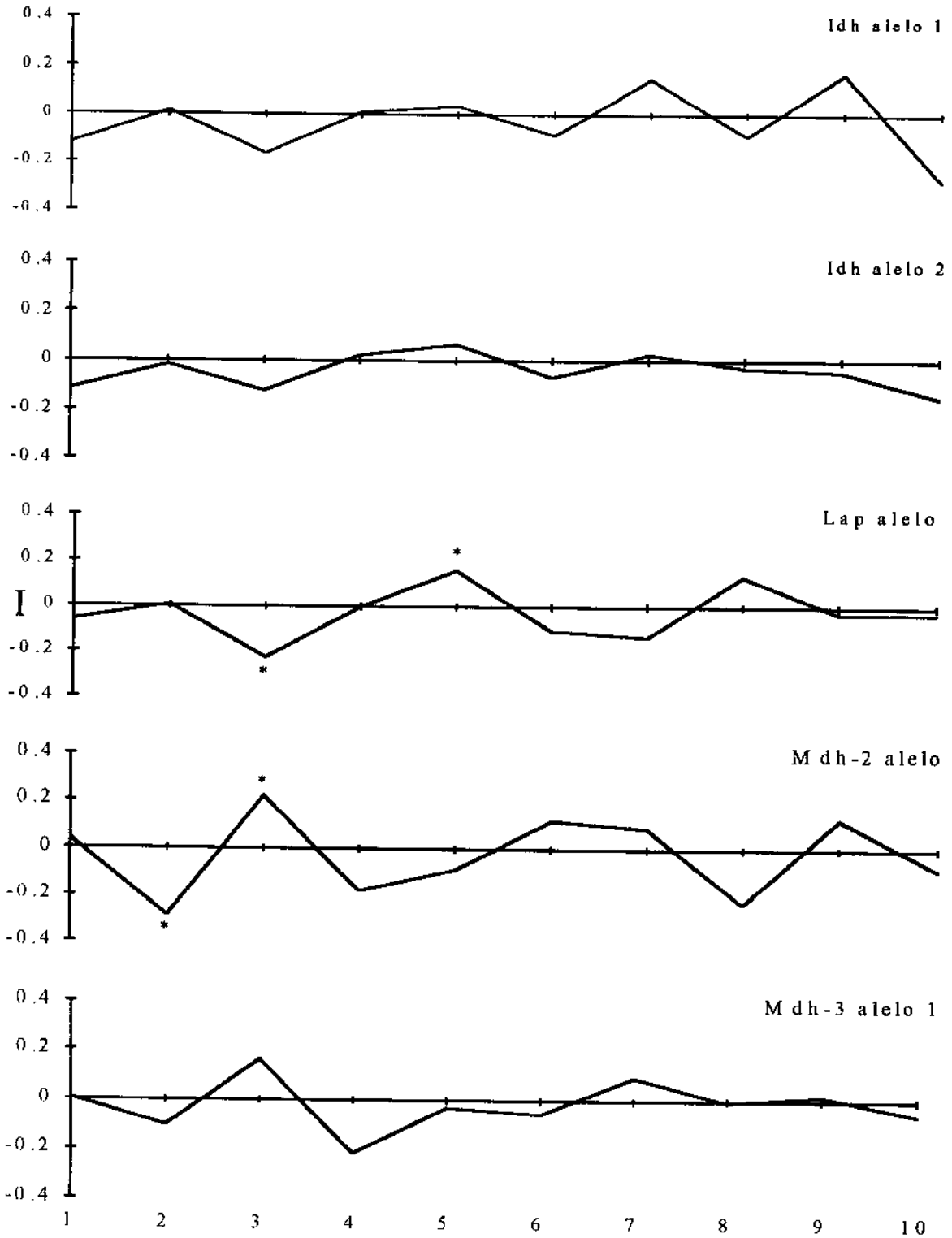


Figura 2. Correlogramas para os alelos Idh alelos 1 e 2, Lap alelo 1, Mdh-2 alelo 1, Mdh-3 alelo 1 para 10 classes de distância (* indica pontos com autocorrelação significativa) em uma população natural de Cedrela fissilis.

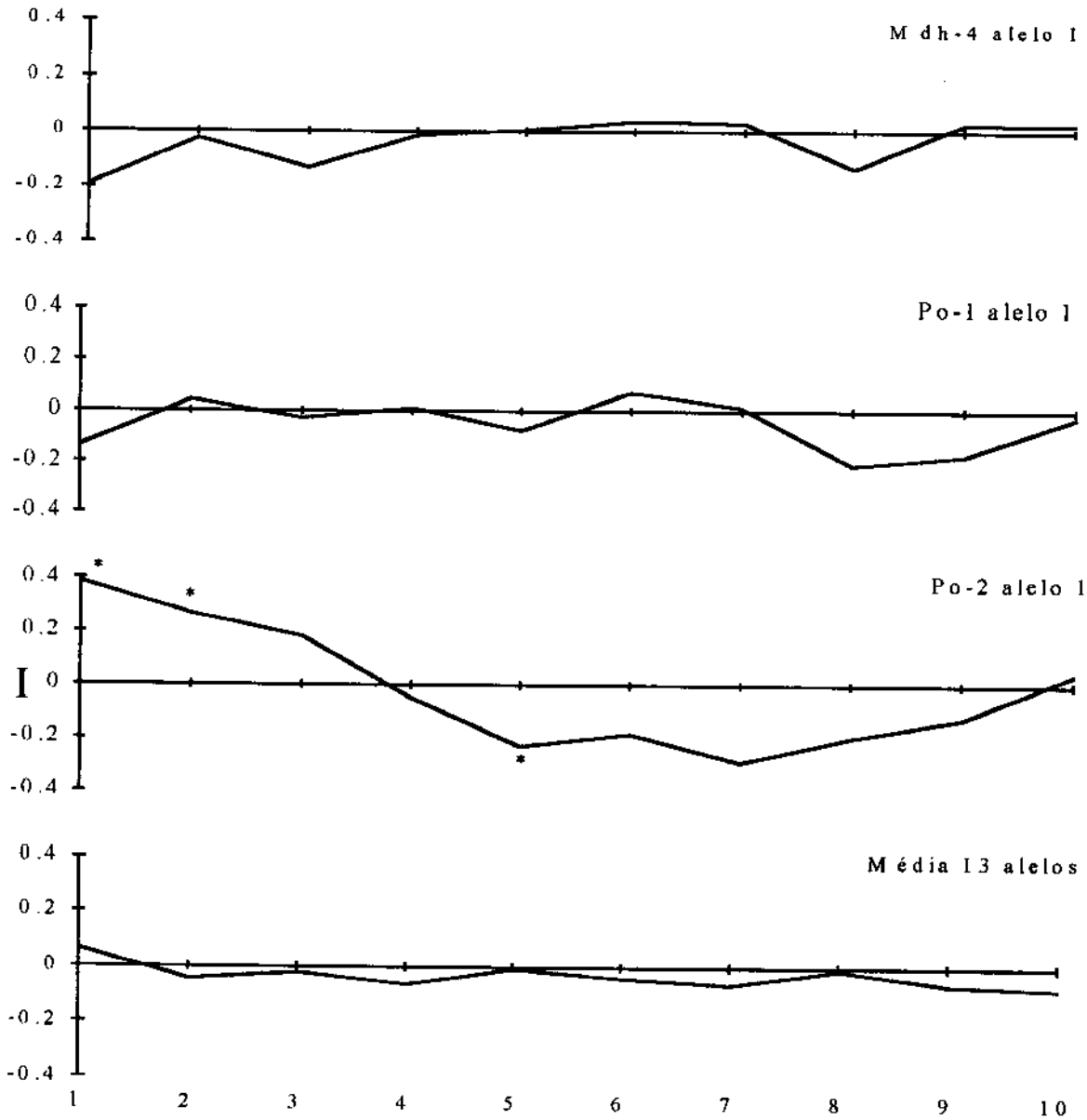


Figura 3. Correlogramas para os alelos Mdh-4 alelo 1, Po-1 alelo 1, Po-2 alelo 1 e para a média dos 13 alelos para 10 classes de distância (* indica pontos com autocorrelação significativa) em uma população natural de Cedrela fissilis.

Quando se analisa as médias dos valores do índice I para os 13 alelos em cada classe de distância (Figura 3), pode-se observar que o índice mantem-se praticamente constante e, portanto, não há a formação de uma estrutura significativa.

4. Discussão:

Os resultados deste trabalho sugerem que esta população não está subdividida em agrupamentos de indivíduos relacionados geneticamente. Dentre os 13 alelos analisados, apenas 3 alelos (6pgdh-2 alelo 1, Pgi-2 alelo 3 e Po-2 alelo 1) mostraram evidências de formação de estrutura espacial. No entanto, se esta estrutura estiver mesmo presente, ela é fraca e ocorre a um nível muito local, como pode ser observado nos correlogramas.

A falta de estrutura espacial encontrada nestes alelos sugere que a seleção local e/ou a deriva genética local devem ser fracas o suficiente para não ocasionar uma estrutura significativa em presença de fluxo gênico.

Segundo DEWEY e HEYWOOD (1988), uma possível explicação para este fato é que a diferenciação local é impedida de alguma forma por seleção balanceada ocorrendo em escala local. Para reforçar esta explicação, pode-se citar evidências de que existem vantagens de heterozigotos isoenzimáticos em relação a homozigotos em diversas espécies, inclusive em *Cedrela fissilis* (Capítulo III). Esta seleção poderia estar eliminando os genótipos oriundos de cruzamento entre indivíduos correlacionados geneticamente e favorecendo os genótipos originados de cruzamento entre indivíduos não correlacionados, proporcionando uma homogeneização da população.

Por outro lado, a seleção natural pode atuar em escala local favorecendo genótipos mais adaptados a determinados sítios e conseqüentemente estruturando a população. EPPERSON e ALLARD (1989) encontraram evidências desse fato para alguns alelos em *Pinus contorta* ssp. *latifolia*, apesar da distribuição de genótipos ter sido, em geral aleatória. Todavia, não há evidências de que este caso esteja ocorrendo na população de *Cedrela fissilis* em estudo.

No entanto, o fator fundamental que previne a formação de estrutura espacial é o fluxo gênico. Se este for suficientemente extenso, ele pode evitar divergências locais da freqüência gênica, causadas tanto por deriva como por seleção local. Em *Cedrela fissilis* há evidências de que o fluxo de pólen pode se dar a longas distâncias, superiores a 950 m.

Porém, não existem dados sobre o fluxo gênico através da dispersão de sementes, que também pode ser relativamente longo em espécies anemocóricas. Assim, nesta população de *Cedrela fissilis*, o fluxo gênico deve ser o principal fator a manter aleatória a distribuição espacial dos genótipos.

Para espécies arbóreas tropicais praticamente não existem dados a respeito da estrutura espacial local. Em *Psychotria nervosa*, uma espécie do subosque de florestas tropicais do Caribe e América Central, DEWEY e HEYWOOD (1988) também não encontraram nenhuma estrutura genética espacial significativa.

HAMRICK et al. (1993), estudando três espécies arbóreas tropicais (*Platypodium elegans, Swartzia simplex* var. *ochnaceae* e *Alseis blackiana*), encontraram uma heterogeneidade espacial significativa nestas espécies, quando analisaram plantas imaturas. *Platypodium elegans*, que ocorre a baixa densidade e apresenta dispersão pelo vento, apresentou a estrutura genética mais forte e *Swartzia simplex*, que ocorre a alta densidade e apresenta dispersão por aves, apresentou a estrutura mais fraca. No entanto, a estrutura genética em *Platypodium elegans* desapareceu em classes de diâmetro maiores. Espécies nas quais a dispersão de sementes de cada árvore adulta ocorre em áreas distintas, apresentariam a formação de estrutura genética forte, mas com a perda de indivíduos devido à alta mortalidade das coortes esta estrutura desapareceria, como ocorreu em *Platypodium elegans*. A população de *Cedrela fissilis* em estudo, por apresentar características semelhantes à de *Platypodium elegans*, pode também apresentar as mesmas características de desaparecimento da estrutura espacial com o aumento das classes de diâmetro.

Em *Cedrela fissilis*, é possível que exista uma estruturação a um nível maior que o abrangido nesta amostragem e por esta razão não detectado. Indivíduos ainda mais distantes do que os amostrados podem apresentar valores mais negativos do índice I. A escala maior de estrutura genética espacial deve estar compatível com a longa distância de fluxo gênico e a baixa densidade de indivíduos, fazendo com que as populações, mantidas coesas pelo fluxo gênico, abranjam áreas muito maiores do que a amostrada neste trabalho.

Capítulo V

Considerações Finais

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a população de *Cedrela fissilis* estudada (34 indivíduos adultos em uma área de 270 ha), apesar de ter uma baixa densidade de indivíduos adultos, apresenta altas taxa de cruzamento, amplo fluxo de pólen, cruzamentos ao acaso e distribuição espacial aleatória de genótipos.

As suposições de que espécies raras estariam sujeitas a um fluxo gênico via pólen restrito, apresentariam autofecundação e cruzamentos preferenciais, e teriam populações estruturadas, não se aplica a esta população de *Cedrela fissilis*.

Dessa forma, para *Cedrela fissilis* supõe-se que a baixa densidade não é um fator que afeta consideravelmente a estrutura genética de suas populações, ou seja, esta espécie apresenta características ecológicas, como dispersão de pólen e sementes, mecanismos de polinização e regeneração, compatíveis com a baixa densidade. Desse modo, esta população de *Cedrela fissilis* apresenta os mesmos processos ecológicos de uma população de uma espécie comum, porém em uma escala espacial muito maior. Assim sendo, a baixa densidade é uma característica normal para esta espécie, pois os processos ecológicos e genéticos apontados anteriormente são compatíveis com a condição de baixa densidade.

Assim, uma espécie rara com estas características não seria formada por populações com um tamanho efetivo pequeno, mas, pelo contrário, teria populações com um número muito grande de indivíduos ocupando extensas áreas.

É de se esperar também que espécies que apresentem características ecológicas semelhantes a *Cedrela fissilis* também possuam estruturas genéticas semelhantes. Dessa forma, espécies secundárias ou de clareira pequena, anemocóricas, com polinização por animais e com populações com baixa densidade de indivíduos, também devem apresentar extenso fluxo gênico, ausência de estruturação espacial, altas taxas de cruzamento e populações com um tamanho efetivo grande, ocupando extensas áreas.

As espécies raras devem estar muito sujeitas a flutuações temporais na dispersão e densidade populacionais, evidenciadas pelo fato dos eventos de recrutamento ocorrerem muito esporadicamente. Porém, se isto ocorrer, estas flutuações não devem afetar consideravelmente a dinâmica da população e sua estrutura genética, principalmente pelo potencial de fluxo de pólen a grandes distâncias.

Estas análises têm várias implicações para a conservação da diversidade genética. Quando se pensa na conservação do potencial evolutivo da espécie e, portanto, na conservação de populações naturais da forma mais original possível, deve-se imaginar áreas na ordem de vários milhares de hectares para uma espécie como *Cedrela fissilis*. Tem sido estimado que um tamanho efetivo de 500 indivíduos, em uma população panmítica, seria suficiente para evitar a perda de diversidade genética devida à deriva e poderia reter variabilidade genética suficiente para responder a alterações das pressões seletivas (FRANKLIN, 1980). Levando-se em conta este tamanho efetivo, para uma população com uma densidade semelhante à encontrada em *Cedrela fissilis* (ao redor de 1 indivíduo adulto a cada 8 ha), seria necessária uma área na ordem de 4000 ha. Áreas desse tamanho compreenderiam uma população desta espécie que teria grandes chances de manter suas características genéticas inalteradas. Para a manutenção da diversidade genética da espécie como um todo, várias áreas como esta seriam necessárias.

Porém, áreas dessa ordem ainda em estado natural são raras na região centro-sul do país, onde predominam pequenos fragmentos, em sua maioria, já bastante alterados pela ação antrópica. Nestes casos, pouco se sabe quanto da diversidade genética das espécies arbóreas é mantida. Para as espécies raras, poucos indivíduos adultos devem restar em cada fragmento florestal após o seu isolamento, o que levaria a uma diminuição da diversidade

causada pela deriva genética. Também é de se esperar que a taxa de endogamia aumente nesta situação com conseqüências na diminuição da aptidão dos indivíduos gerados, mesmo levando-se em conta um possível aumento da densidade populacional.

Se considerarmos uma população com um tamanho efetivo mínimo de 50 indivíduos, a qual, segundo FRANKEL e SOULÉ (1981), poderia manter suficiente diversidade genética por algumas gerações, esta ocuparia uma área de 400 ha, considerando-se uma densidade média de 1 individuo a cada 8 ha. Áreas menores que esta teriam alta probabilidade de apresentar problemas relacionados com o aumento da endogamia e a perda de diversidade genética nas populações de espécies raras, após algumas gerações.

No entanto, se o fluxo gênico ocorrer entre fragmentos, muito da diversidade genética original poderá se manter. Porém, devido às grandes distâncias entre fragmentos e a um ambiente muito alterado, é pouco provável que um fluxo gênico considerável ocorra entre fragmentos das regiões mais deflorestadas, como acontece na maior parte do interior do Estado de São Paulo. Estas suposições precisam ser melhor evidenciadas com o estudo de espécies arbóreas em populações naturais e fragmentadas.

Para a coleta de sementes de *Cedrela fissilis*, com a finalidade de conservação genética e melhoramento ou utilização em projetos de revegetação, onde se deseja amostrar grande parte da diversidade genética de uma população, não há a necessidade de se coletar sementes de um número muito grande de indivíduos em uma população natural, pelo fato da taxa de cruzamento ser alta e o fluxo de pólen ser extenso. No entanto, se taxas de cruzamento por indivíduo apresentarem comumente valores mais baixos, como o encontrado em uma matriz deste trabalho, o número de árvores amostradas deve ser aumentado.

Portanto, os dados sobre diversidade genética gerados em populações naturais são muito importantes principalmente pelo fato de serem um referencial para a conservação de áreas primárias e a restauração da diversidade em áreas antropizadas.

Conclusões

A diversidade genética apresentada pela população estudada de *Cedrela fissilis* (H=0,222) está em torno da média das populações de espécies arbóreas tropicais já estudadas.

Cedrela fissilis é uma espécie preferencialmente alógama (t_m=0,92), porém pode apresentar variações da taxa de cruzamento entre árvores ($t_{individual}$ entre 0,62 e 1,08).

O fluxo gênico, via pólen, em *Cedrela fissilis* pode ocorrer a longa distância (acima de 950 m) o que condiz com as grandes distâncias encontradas entre indivíduos.

A população de *Cedrela fissilis* não apresenta estruturação genética, evidenciando que o fluxo gênico é suficientemente amplo para prevenir a formação de estrutura a partir da deriva genética e/ou da seleção local.

Os resultados obtidos sobre o fluxo gênico via pólen, sistema reprodutivo e distribuição espacial dos genótipos são concordantes entre si e coerentes com a baixa densidade da população.

Referências Bibliográficas

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. e PASSADOR, G.C. 1991. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. UFV, Viçosa-MG, 242 p.

ALVAREZ-BUYLLA, E.R. e GARAY, A.A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer species. **Evolution, 48**(2):437-453.

AMARAL, L.G. 1981. **Flora do estado de Goias**. Coleção Rizzo, Goiania, Editora da Universidade de Goias, 2(37):1-56.

BAWA, K.S. e ASHTON, P.S. 1991. Conservation of rare trees in tropical rain forests: a genetic perspective. In: HOLSINGER, D. e FALK, A. (ed.) **Genetics and conservation of rare plants.** St. Louis, MO. pp.62-74.

BAWA, K.S. e O'MALLEY, D.M. 1987. Estudios genéticos y de sistemas de cruzamiento en algumas especies arbóreas de bosques tropicales. **Rev. Bio. Trop., 35**(suplemento 1):177-188.

BOSHIER, D.C.; CHASE, M.R. e BAWA, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system . **American Journal of Botany 82**:476-483.

BROWN,A.H.D. e WEIR, B.S. 1983. Measuring genetic variability in plant populations. In: Tanksley, S.D. e Orton, T.J. (eds.) **Isozymes in plant genetics and breeding.** Part A. Elsevier, Amsterdam, p.219-239.

BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M.; APSIT, V.; PRANCE, G.T. e BAWA, K.S. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. **Theoretical Applied Genetics, 76**:923-928.

CARVALHO, P.E.R. 1994. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo - PR, EMBRAPA - CNPF. 640p.

CHAPLIN, G.E. 1980. Progress with provenance exploration and seed collection of *Cedrela* spp. IN: **Eleventh Forestry Conference, Commonwealth Forestry Institute**, England. 17p.

CLAYTON, J. e TRETIAK, D. 1972. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of Fisheries Resesrch Board of Canada, 29**:1169-1172.

CONNELL, J.H. 1971. On the role of natural enimies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. In: DEN BOER, P.J. e GRANDWELL, G.R. (ed.) **Dynamics of populations**. PUDOC, Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation. p.298-312.

DEWEY, S.E. e HEYWOOD, J.S. 1988. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. I. Distribution of genotypes. **Evolution, 42**:834-838.

EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, N. e PIÑERO, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocarium mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity, 69**:217-228.

EPPERSON, B.K. 1990a. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler,A.L. e Weir, B.S. (eds) **Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources.** Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp.229-253.

EPPERSON, B.K. 1990b. Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. **Genetics, 124**:757-771.

EPPERSON, B.K. e ALLARD, R.W. 1989. Spatial autocorrelation analisys of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. **Genetics, 121**: 369-377.

EPPERSON, B.K. e CLEGG, M.T. 1986. Spatial autocorrelation analisis of flower color polymorphism within substructured populations of morning glory (*Ipomoea purpurea*). **Am. Nat. 128**:840-858.

FAO 1986. **Databook on endangered tree and schrub species and provenances**. Roma, Food and Agriculture Organization. 524p.

FOSTER, R.B. e HUBBELL, S.P. 1990. The floristic composition of the Barro Colorado Island Forest. In: GENTRY,A.H. (ed.) **Four Neotropical Rain Forests**. Yale Un. Press, London. 627p.

FRANKEL, O.H. e SOULÉ, M.E. 1981. **Conservation and evolution**. University Press, New York, Cambridge.

FRANFLIN, I.R. 1980. Evolutionary change in small populations. In: SOULÉ, M.E. e WILCOX, B.A. (ed.) **Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets, pp.135-149.

GANDARA, F.B. 1993. Enxertia em *Cedrela fissilis*: Vell. (Meliaceae): utilização para conservação e estudos de variabilidade genética. **1º Congresso Florestal Panamericano e 7º Congresso Florestal Brasileiro - Anais**, Curituba-PR, Vol.2, pp. 427-429.

HALL, P.; ORREL, L.C. e BAWA, K.S. 1994. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **American Journal of Botany, 81**(9):1104-1111.

HAMRICK, J.L. 1982. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany 69**:1685-1693.

HAMRICK, J.L. e ALLARD, R.W. 1972. Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69**:2100-2104.

HAMRICK, J.L. e GODT, M.J.W. 1990. 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, Sunderland, Massachusetts, pp.43-63.

HAMRICK, J.L. e LOVELESS, M.D. 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica, 18**(3):201-207.

HAMRICK, J.L. e LOVELESS, M.D. 1986. 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.

HAMRICK, J.L. e LOVELESS, M.D. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reprodutive biology. In: Bock, J.H. e Linhart, Y.B. (eds.) **The evolutionary ecology of plants.** Westview Press, Boulder, CO, pp.129-146.

HAMRICK, J.L.; MITTON, J.B. e LINHART, Y.B. 1981. Levels of genetic variation in trees: Infuence of life history characteristics. In: Conkle, M.T. (ed.) **Isoenzymes of North American Forest Trees and Forest Insects**. USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48, USDA Forest Service, Berkeley, CA, pp.35-41.

HAMRICK, J.L. e MURAWSKI, D.A. 1990. The breeding structure of tropical tree populations. **Plant Species Biology, 5**:157-165.

HAMRICK, J.L. e MURAWSKI, D.A. 1991. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology,** 7:395-399.

HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A. e NASON,J.D. 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio, 107/108**:281-297.

HOWE, H.F. e SMALLWOOD, J. 1982. Ecology and seed dispersal. **Ann. Rev Ecol. Syst., 13**:201-228.

HUBBELL, S.P. e FOSTER, R.B. 1986. Commonness and rarity in a neotropical forest: implications for tropical tree conservation. In: SOULÉ, M.E. (ed.) **Conservation Biology**. Sinauer Ass. Publ., Sunderland. 584p.

JANZEN,D.H. 1970. Herbivores and the number of tree especies in tropical forests. **American Naturalist, 104**:501-528.

KAGEYAMA, P.Y. 1990. Genetic structure of tropical tree species of Brazil. In: BAWA, K.S. e HADLEY, M. **Reproductive ecology of tropical forest plants**. Man and Biosphere Series Vol. 7, UNESCO e The Partheon Publishing Group. p.375-387.

KAGEYAMA, P.Y. e GANDARA, F.B. 1993. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. **III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira - Anais**, Academia de Ciências do Estado de São Paulo.

KAGEYAMA, P.Y.; NAMKOONG, G. e ROBERDS, J. 1992. **Genetic diversity in tropical forests in the state of São Paulo - Brazil**. Não Publicado.

LEÃO, N.V.M. 1990. **Dispersão de sementes de espécies arbóreas na Floresta Nacional do Tapajós**. Piracicaba, 152p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

LEVIN, D.A. e KERSTER, H.W. 1974. Gene flow in seed plants. In: Dobzhanski, T.; Hecht, M.K.; Steene, W.D. (ed.) **Evolutionary biology**. New York, Plenum Press, pp.139-220.

LOVELESS, M.D. e HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annu. Rev. Ecol. Syst. 15**:65-95.

LOVELESS, M.D. e HAMRICK, J.L. 1987. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. **Rev. Biol. Trop., 35**(supl.1):165-175.

MAINIERI,C. e CHIMELO,J.P. 1989. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. São Paulo, IPT-Instituto de Pesquisas Tecnológicas. 418p.

MORAES, M.L.T. 1992. **Variabilidade genéica por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão Anacardiaceae (Syn: Astronium urundeuva (Fr. Allemão) Engler**. Piracicaba, 139p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

MORELLATO, L.P.C. 1991. **Estudo da fenologia de árvores e lianas de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil**. Campinas, 176p. (Doutorado - Instituto de Biologia - UNICAMP).

MURAWSKI, D.A. e BAWA, K.S. 1994. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **American Journal of Botany, 81**(2):155-160.

MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B. e BAWA, K.S. 1994. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forests. **Biotropica, 26**(1): 23-29.

MURAWSKI, D.A. e HAMRICK, J.L. 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity, 67**: 167-174.

MURAWSKI, D.A. e HAMRICK, J.L. 1992a. The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering-tree density: a test of predictions. **Biotropica, 24**(1):99-101.

MURAWSKI, D.A. e HAMRICK, J.L. 1992b. Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Panama. **Journal of Heredity, 83**(6):401-404.

MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L.; HUBBELL, S.P. e FOSTER, R.B. 1990. Mating systems of two Bombacaceous trees of a neotropical moist forest. **Oecologia, 82**:501-506.

NOGUEIRA, J.C.B. 1977. Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas. **Boletim Técnico - IFSP**, São Paulo, (24):1-74, 1977.

O'MALLEY, D.M. e BAWA, K.S. 1987. Mating system of a tropical rain forest tree species. **American Journal of Botany, 74**(8):1143-1149.

O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T. e BAWA, K.S. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae): 2. Mating system. **Theoretical and Applied Genetics, 76**: 929-932.

PAIVA, J.R. 1992. **Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.).** Piracicaba. 144p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. e CONTEL, P.B. 1994. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müll. Arg.) I. Genetic variation in natural populations. **Silvae Genetica, 43**(5/6):307-312.

PEDROSA-MACEDO, J.H. 1993. **Manual de pragas em florestas: pragas florestais de sul do Brasil. Vol. 2**. IPEF/SIF. 112p.

PENNINGTON, T.D. e STYLES, B.T. 1981. Meliaceae. **Flora Neotropica, Monograph, 28**. New York, New York Botanical Garden. 470p.

PÉREZ-NASSER, N.; EGUIARTE, L.E. e PIÑERO, D. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). **American Journal of Botany, 80**(1):45-52.

PERRY, D.J. e KNOWLES, P. 1991. Spatial genetic structure within three sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) stands. **Heredity, 66**:137-142.

PINAZZO,J. 1992. Especies forestales del Paraguay en peligro de extincion. **Revista Forestal, Universidad Nacional de Asuncion 8**(1):14-15.

PINHEIRO, A.L.; MARAGON, L.C. e PAIVA, G.L.R.M. 1990a. Características fenológicas do cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) em Viçosa, Minas Gerais. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, (21):21-26.

PINHEIRO, A.L.; RAMALHO, R.S.; VIDAL, W.N. e VIDAL, M.R.R. 1990b. Flórula arbórea de Viçosa. II. Meliaceae (*Cedrela* spp.). **Revista Ceres 37**(212):289-299.

RAMALHO, R.S. 1978. **Dendrologia**. Viçosa, Imprensa Universitária, UFV. 123p.

REITZ, R.; KLEIN, R.M. e REIS, A. 1978. **Projeto madeira de Santa Catarina** 145p.

RITLAND, K. 1985. The genetic mating structure of subdivided populations: I. Open-mating model. **Theoretical Population Biology, 27**:51-74.

RITLAND, K. 1990. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity, 81**:235-237.

RITLAND, K. e EL-KASSABY, Y.A. 1985. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as show by an efficient multilocus model. **Theoretical and Applied Genetics, 71**:375-384.

RITLAND, K. e JAIN, S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity, 47**(1):35-52.

SANTOS, E.M.G. 1994. **Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpiniaceae)**. Piracicaba, 114p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

SCHNABEL, A. e HAMRICK, J.L. 1990. Organization of genetic diversity within and among populations of *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). **Am. J. Bot.,** 77:1060-1069.

SCHNABEL, A; LAUSHMAN, R.H. e HAMRICK, J.L. 1991. Comparative genetic structure of two coocurring tree species, *Maclura pomifera* (Moraceae) and *Gleditsia triacanthos* (Leguminoseae). **Heredity, 67**:357-364.

SMITH, J. e EARLE, C. 1960. A revision of *Cedrela* (Meliaceae). **Freldiana, 29**(5):295-341.

SOKAL, R.R.; JACQUEZ, G.M. e WOOTEN, M.C. 1989. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. **Genetics, 121**: 845-855.

SOKAL, R.R. e ODEN, N.L. 1978a. Sapatial autocorrelation in biology. 1. Methodology. **Biol. J. Linn. Soc. 10**: 199-228.

SOKAL, R.R. e ODEN, N.L. 1978b. Sapatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. **Biol. J. Linn. Soc. 10**: 229-249.

SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C. e GASTONY, G.L. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal, 73**(1):9-26.

STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H. 1980. **Principles and procedures of statistics**, 2ª ed.. New York, McGraw-Hill, 475p.

STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M. e SMITH,J.S.C. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). **Technical Bulletin 286**, North Caroline State University, Raleigh, North Caroline, 87p.

STYLES, B.T. 1972. The flower biology of the Meliaceae and its bearing on tree breeding. **Silvae Genetica 21**(5):175-182.

STYLES, B.T. e KHOSLA, P.K. 1976. Cytology and reprodutive biology of Meliaceae. In: Burley, J. e Styles, B.T. (eds.) **Tropical trees: variation, breeding and conservation.** Linnean Society of London Series n.2, Academic Press, London. p.61-68.

STYLES, B.T. e VOSA,C.G. 1971. Chromosome number in the Meliaceae. **Taxon, 20**(4):485-499.

SWOFFORD, D.L. e SELANDER, R.B. 1989. **Biosys-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics.** Release 1,7 Illinouis Natural History Survey, Illinois.

VENCOVSKY, R. 1992. Análise de variância de frequências alélicas. In: **Congresso Latino Americano de Genética, 10º**, Rio de Janeiro, Proceedings, Revista Brasileira de Genética, 15(suplemento 1):53-60.

VICTOR, M.A.M. 1975. **A devastação florestal**. Sociedade Brasileira de Silvicultura, São Paulo.

WENDEL, J.F. e WEEDEN, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D.E. e Soltis, P.S. (ed.) **Isozymes in plant biology**. Portland, Dioscorides Press, pp.5-45.

WEIR, B.S. 1990. **Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data.** North Caroline State University, Sinauer Associates Inc. Pub., Suderland, Massachusetts. 377p.

WRIGHT, S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist, 56**:330-338.

WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. **Genetics, 28**: 114-138.

WRIGHT, S. 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics, 31**: 39-59.

YAMADA, M.M. e GURIES, R.P. 1989. **A manual of estarch gel electrohoresis: new chocolate lovers edition**. Staff Paper Series nº 39, Department of Forestry, University of Wisconsin, Madison, 22p.

YOUNG, A.G.; WARWICK, S.I. e MERRIAM, H.G. 1993. Genetic variation and structure at three spatial acales for *Acer saccharum* (sugar maple) in Canada and the implication for conservation. **Canadian Journal of Forestry Research, 23**:2568-2578.