



# ESTRUTURA GENÉTICA DE *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. ~ Apocynaceae (PEROBA ROSA) EM UMA FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL NO ESTADO DE SÃO PAULO

Helena Maria Maltez

Orientador: Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama

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

CAMPINAS  
Estado de São Paulo  
março 1997

9914942

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato (a)  
Helena Maria Maltez  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

14/03/97



ESTRUTURA GENÉTICA DE  
*Aspidosperma polyneuron* Muell.Arg. - Apocynaceae  
(PEROBA ROSA) EM UMA FLORESTA ESTACIONAL  
SEMIDECIDUAL NO ESTADO DE SÃO PAULO

Helena Maria Maltez



Foto: Helena Maria Maltez

CAMPINAS  
Estado de São Paulo  
março 1997

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

M298e Maltez, Helena Maria  
Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. -  
Apocynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecidual  
no Estado de São Paulo / Helena Maria Maltez. - - Campinas, SP:  
[s.n.], 1997.  
132p. : ilus.

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

1. Variabilidade genética. 2. Plantas - Conservação. 3. Florestas  
Tropicais. I. Kageyama, Paulo Yoshio. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

ESTRUTURA GENÉTICA DE  
*Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae  
(PEROBA ROSA) EM UMA FLORESTA ESTACIONAL  
SEMIDECIDUAL NO ESTADO DE SÃO PAULO

Helena Maria Maltez

**LOCAL E DATA:** Campinas, 11 de março de 1997

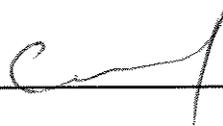
**BANCA EXAMINADORA:**

**TITULARES:**

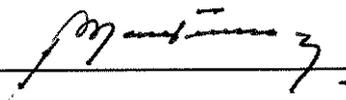
Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama - ESALQ/USP



Prof. Dr. George John Shepherd - UNICAMP



Prof. Dr. Roland Vencovsky - ESALQ/USP



**SUPLENTE:**

Prof. Dr. Flávio Antônio Maes dos Santos - UNICAMP



Dedico o meu trabalho à Cecília, minha filha. Que seus filhos possam desfrutar da paz e prazer que as florestas podem nos proporcionar, possam conhecer todas as mais diversas e fascinantes formas de vida que nela existem, e saibam perpetuar todos os recursos nela existentes, para sempre...

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, estiveram presentes nas várias etapas de minha formação acadêmica, especialmente:

Ao Prof. Paulo Y. Kageyama, pela orientação, apoio, amizade e por ter me dado a oportunidade de, não só estudar e conhecer melhor a floresta tropical, mas também de me apaixonar por ela e fazer dessa paixão a força para a luta pela sua conservação.

Ao curso de pós-graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Instituto Florestal, que permitiu que esse trabalho fosse desenvolvido em uma de suas Estações Ecológicas, e, principalmente, ao engenheiro Wilson Contieri que não poupou esforços para que o trabalho pudesse ser desenvolvido nesta área da melhor forma possível.

À Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, que financiou as viagens de campo, material de laboratório e reagentes, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido realizado.

À CAPES e ao CNPq, pelas bolsas de iniciação científica e mestrado concedidas.

À Fazenda Cambuhy, que doou as mudas de peroba rosa para realização das enxertias.

Ao viveiro do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP e seus funcionários, pela cessão do espaço na casa de vegetação para produção das mudas enxertadas e pelo apoio técnico.

Aos Professores da UNICAMP e ESALQ/USP que contribuíram de forma marcante para a minha formação.

Aos Professores George Shepherd e Louis Bernard Klaczko da UNICAMP, pelas valiosas sugestões no processo de pré-banca.

Ao Professor Maurício Sedrez dos Reis, da UFSC, pelas sugestões inestimáveis no processo de pré-banca, pela amizade e por ser um pesquisador tão digno e ético, que me serve de exemplo e força.

Ao Professor Roland Vencovsky, pelas aulas brilhantes que tive o prazer de assistir e por ter aceito participar da banca de defesa desta dissertação.

À Elza Martins Ferraz, pelo apoio nas atividades de laboratório e, principalmente, pela amizade e ajuda constantes.

Ao Gelson, nosso técnico e faz-tudo que, além de realizar as coletas de folhas e frutos e ajudar nas atividades de campo, foi amigo, dando apoio em diversas etapas do projeto.

Aos colegas de Laboratório, Alexandre M. Sebbenn, Cristina M<sup>a</sup> B. Lacerda, Lina M<sup>a</sup> I. de Souza, Nadja Lepsch-Cunha, pelas discussões, amizade e apoio.

Ao colega e amigo Flávio B. Gandara, que nunca soube dizer um único não e a quem sou grata pelas dicas, por todas as sugestões nas mais diversas etapas deste trabalho e pela discussão da redação final.

Ao Carlos Eduardo S. Seoane, pela valiosa ajuda de campo, pelos galhos quebrados, enfim, pela grande amizade.

Aos meus pais, que me ensinaram desde o berço o prazer e a delícia de ter sempre um “por quê?” na ponta da língua e me deram todo o apoio para que eu chegasse até aqui.

À Cecília, por existir, e por todas as horas que lhe roubei e, finalmente, ao Maurício, pelo apoio, força, amizade, respeito e companheirismo.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iv
SUMÁRIO .....	v
RESUMO .....	xiii
SUMMARY .....	xv
<b>CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL</b>	
1. Apresentação .....	1
2. Objetivos .....	5
3. <i>Aspidosperma polyneuron</i> Muell. Arg. (peroba rosa).....	6
4. Local de Estudo .....	15
5. Populações Analisadas.....	17
<b>CAPÍTULO II: DIVERSIDADE GENÉTICA EM DUAS POPULAÇÕES DE</b> <b><i>Aspidosperma polyneuron</i> Muell. Arg. (PEROBA ROSA)</b>	
1. Introdução.....	19
2. Objetivos .....	21
3. Revisão da Bibliografia.....	22
3.1. Estrutura Populacional.....	22
3.1.1. Densidade e Distribuição Espacial.....	22
3.1.2. Distribuição de Tamanho .....	23
3.2. Estrutura Genética de Populações Naturais.....	24
3.2.1. Variabilidade Genética e sua Distribuição Entre e Dentro de Populações Naturais.....	24
3.2.2. Fluxo Gênico .....	28
3.2.3. Implicações sobre Conservação e Manejo.....	28
4. Metodologia.....	30
4.1. Levantamento de Campo e Enxertia.....	30
4.2. Transporte e Armazenamento de Folhas.....	31

4.3. Densidade e Distribuição Espacial.....	31
4.4. Distribuição de Tamanho .....	33
4.5. Análises Eletroforéticas.....	33
4.5.1. Extração .....	33
4.5.2. Tampões de Eletrodo e Gel e Sistemas Enzimáticos .....	35
4.5.3. Condições da Corrida.....	36
4.5.4. Leitura e Interpretação dos zimogramas.....	36
4.6. Metodologia Estatística .....	37
4.6.1. Variabilidade Genética .....	37
4.6.2. Verificação do Ajuste ao Modelo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)....	38
4.6.3. Verificação do Ajuste ao Modelo do Equilíbrio de Endogamia de Wright.....	39
4.6.4. Caracterização da Distribuição da Variabilidade Entre e Dentro das Populações .....	39
4.6.5. Estimativa do Fluxo Gênico .....	40
4.6.6. Taxa de Cruzamento Aparente .....	41
5. Resultados.....	42
5.1. Levantamento das Populações .....	42
5.2. Enxertia das Estacas .....	42
5.3. Densidade e Distribuição Espacial.....	45
5.4. Distribuição de Tamanho .....	45
5.5. Interpretação Genética dos Zimogramas .....	47
5.6. Estrutura Genética .....	53
5.6.1. Para as Duas Populações de Indivíduos Adultos.....	53
5.6.1.1. Frequências Alélicas, Polimorfismo, Número Médio de Alelos por Loco e Heterozigosidades Observada e Esperada.....	53
5.6.1.2. Verificação dos Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Equilíbrio de Endogamia de Wright.....	55
5.6.1.3. Índices de Fixação de Wright (F).....	59
5.6.1.4. Distâncias Genéticas Entre as Populações 1 e 2 e Fluxo Gênico.....	61
5.6.1.5. Taxa de Cruzamento Aparente .....	62
5.6.2. Para a Amostra de Indivíduos Jovens .....	63
5.6.2.1. Frequências Alélicas, Polimorfismo, Número Médio de Alelos por Loco e Heterozigosidades Observada e Esperada.....	63

5.6.2.2. Verificação dos Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	64
5.6.2.3. Índices de Fixação de Wright (F).....	65
6. Discussão .....	67
6.1. Levantamento da População e Enxertia das Estacas .....	67
6.2. Densidade e Distribuição Espacial.....	68
6.3. Distribuição de Tamanho .....	69
6.4. Estrutura Genética .....	71
7. Conclusões.....	77

**CAPÍTULO III: ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DENTRO DE DUAS  
POPULAÇÕES DE *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.  
(PEROBA ROSA)**

1. Introdução.....	78
2. Objetivos.....	79
3. Revisão da Bibliografia .....	79
4. Metodologia.....	80
5. Resultados.....	83
5.1. Indivíduos Jovens .....	83
5.2. Adultos.....	85
5.2.1. População 1 .....	85
5.2.2. População 2 .....	88
6. Discussão .....	90
7. Conclusões.....	92

**CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1. Estrutura Genética.....	93
2. Conservação e Manejo .....	95
3. Sugestões para Trabalhos Futuros .....	97

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>
--	-----------

ANEXOS.....	113
1. Protocolos para Revelação dos Sistemas Enzimáticos Utilizados no Presente Estudo.....	114
2. Espécies Arbóreas Tropicais Estudadas Via Marcadores Alosímicos.....	116
3. Frequências Genotípicas para os Locos Polimórficos.....	122
4. Frequências Genotípicas Esperadas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg e no Equilíbrio de Endogamia de Wright.....	124
5. Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) Utilizando o Método de Classes de Distância.....	125
6. Correlogramas.....	128

## SUMÁRIO DE TABELAS

<u>Tabela 1</u> : Densidade de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) encontrada em levantamentos fitossociológicos realizados em fragmentos florestais de diferentes tamanhos no Estado de São Paulo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	10
<u>Tabela 2</u> . Solução de extração utilizada nas análises alozímicas de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa). Receita modificada a partir da solução de extração número 1 de ALFENAS et al. (1991). Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	34
<u>Tabela 3</u> . Sistemas enzimáticos e respectivos sistemas de tampão gel/eletrodo, amperagem e voltagem utilizados nas análises alozímicas de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa). Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	36
<u>Tabela 4</u> : Número de indivíduos analisados por loco (n), frequências alélicas ( $\hat{p}_i$ ), e heterozigosidades observada e estimada ( $\hat{H}_o$ e $\hat{H}_e$ ) em cada loco alozímico analisado nas Populações 1 e 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	53
<u>Tabela 5</u> : Estimativas de diversidade genética, via marcadores alozímicos, para as Populações 1 e 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	55
<u>Tabela 6</u> : Verificação da aderência das estimativas encontradas para 5 locos polimórficos ao modelo do EHW, através dos testes do $\chi^2$ e exato de Fisher. População 1 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	56
<u>Tabela 7</u> : Verificação da aderência das estimativas encontradas para 4 locos polimórficos ao modelo do EHW, através dos testes do $\chi^2$ e exato de Fisher. População 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.. ....	57
<u>Tabela 8</u> : Verificação da aderência das estimativas encontradas para os locos 6Pgdh-1 (População 1) e Lap-1 (População 2) ao modelo do Equilíbrio de Endogamia de Wright,	

através do teste $\chi^2$ . Populações de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	59
<u>Tabela 9</u> : Número de heterozigotos observados e esperados, índices de fixação de Wright e teste de $\chi^2$ de LI e HORVITZ (1953) para os 5 locos alozímicos polimórficos analisados na População 1 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	60
<u>Tabela 10</u> : Número de heterozigotos observados e esperados, índices de fixação de Wright e teste de $\chi^2$ de LI e HORVITZ (1953) para os 4 locos alozímicos polimórficos analisados na População 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	61
<u>Tabela 11</u> : Estimativas dos Índices de Fixação de Wright ( $\hat{F}_{IS}$ , $\hat{F}_{IT}$ e $\hat{F}_{ST}$ ) para as duas populações de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	61
<u>Tabela 12</u> : Estimativas de $H_T$ , $H_S$ , $D_{ST}$ e $G_{ST}$ em duas populações de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	62
<u>Tabela 13</u> : Número de indivíduos analisados por loco (n), frequências alélicas ( $\hat{p}_{i,j}$ ), e heterozigosidades observada e estimada ( $\hat{H}_o$ e $\hat{H}_e$ ) para cada loco analisado na amostra de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) da População 1. Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	63
<u>Tabela 14</u> : Estimativas de diversidade genética, via marcadores alozímicos, na amostra de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) da População 1 na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	64
<u>Tabela 15</u> : Verificação da aderência das estimativas encontradas para três locos polimórficos ao modelo do EHW, através dos testes do $\chi^2$ e exato de Fisher. Amostra de indivíduos jovens da População 1 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	65
<u>Tabela 16</u> : Número de heterozigotos observados e esperados, índices de fixação de Wright e teste do $\chi^2$ de LI e HORVITZ (1953) para os 3 locos alozímicos polimórficos analisados na amostra de indivíduos jovens da População 1 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	66
<u>Tabela 17</u> : Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) analisando-se 4 alelos em uma amostra de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, a partir dos métodos: conexão de Gabriel e vizinho mais próximo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	83
<u>Tabela 18</u> : Intervalos de distância utilizados na construção dos correlogramas de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.....	84

<u>Tabela 19:</u> Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) analisando-se 7 alelos da População 1 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, a partir dos métodos: conexão de Gabriel e vizinho mais próximo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997 .....	86
<u>Tabela 20:</u> Intervalos de distância utilizados na construção dos correlogramas das Populações 1 e 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997 .....	86
<u>Tabela 21:</u> Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) analisando-se 7 alelos da População 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, a partir dos métodos: conexão de Gabriel e vizinho mais próximo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997 .....	88

## ANEXOS

<u>Tabela 22:</u> Estimativas da diversidade genética de diversas espécies arbustivo/arbóreas tropicais já estudadas via marcadores alozímicos: taxa de polimorfismo ( $\hat{P}$ ), número de alelos por loco ( $\hat{A}$ ), número de alelos por loco polimórfico ( $\hat{A}_p$ ), heterozigosidade total ( $\hat{H}_T$ ), heterozigosidade dentro de populações ( $\hat{H}_s$ ), heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ), heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_e$ ). Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	116
<u>Tabela 23:</u> Distribuição da variabilidade genética entre populações (adultos) através das estimativas de $G_{ST}$ e $F_{ST}$ e da taxa de fluxo gênico ( $Nm$ ) de diversas espécies arbustivo/arbóreas tropicais já estudadas via marcadores alozímicos. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	120
<u>Tabela 24:</u> Índices de fixação dos adultos ( $\hat{F}_{ad}$ ) e para a progênie ( $\hat{F}_{prog}$ ), de algumas espécies arbustivo/arbóreas tropicais já estudadas via marcadores alozímicos. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	121
<u>Tabela 25:</u> Frequências genotípicas nos 5 locos alozímicos polimórficos analisados para as populações de indivíduos adultos de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997 .....	122
<u>Tabela 26:</u> Frequências genotípicas nos 3 locos alozímicos polimórficos analisados para a amostra de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	123
<u>Tabela 27:</u> Frequências genotípicas esperadas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (ou equilíbrio de panmixia) e no Equilíbrio de Endogamia de Wright, no caso de locos com 3 ou mais alelos. (adaptada por REIS, 1996 a partir de WRIGHT, 1951) .....	124
<u>Tabela 28:</u> Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) em 19 classes de distância, analisando-se 4 alelos na amostra de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP; distância média entre indivíduos pareados e número de comparações efetuadas. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	125

Tabela 29: Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) em 14 classes de distância, analisando-se 7 alelos na População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP; distância média entre indivíduos pareados e número de comparações efetuadas. Campinas-SP, UNICAMP. 1997..... 126

Tabela 30: Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) em 14 classes de distância, analisando-se 7 alelos na População 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP; distância média entre indivíduos pareados e número de comparações efetuadas. Campinas-SP, UNICAMP. 1997..... 127

## SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) - Extraído de MARCONDES-FERREIRA NETO, 1988 ..... 8

Figura 2: Localização da Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, área de floresta estacional semidecidual onde foram amostradas as duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) analisadas no presente estudo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. .... 16

Figura 3: Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, com a localização das duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) analisadas no presente estudo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997 ..... 18

Figura 4: Croqui da distribuição dos indivíduos da População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. .... 43

Figura 5: Croqui da distribuição dos indivíduos da População 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. .... 44

Figura 6: Distribuição diamétrica dos indivíduos amostrados na população 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. .... 46

Figura 7: Distribuição diamétrica dos indivíduos amostrados na população 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997 ..... 46

Figura 8: Distribuição de altura de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na amostra de indivíduos jovens da População 1 coletada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. .... 47

Figura 9: Interpretação genética dos zimogramas dos sistemas enzimáticos polimórficos utilizados no estudo de duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997..... 48

Figura 10: Fotografia dos géis obtidos através de colorações específicas para os sistemas enzimáticos utilizados na estimativa das frequências alélicas em duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. .... 51

<b>Figura 11:</b> Correlograma dos 4 alelos analisados em uma amostra de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	84
<b>Figura 12:</b> Correlograma da média dos valores de I dos 4 alelos analisados em uma amostra de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	85
<b>Figura 13:</b> Correlograma dos 7 alelos analisados na População 1 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	87
<b>Figura 14:</b> Correlograma da média dos valores de I dos 7 alelos analisados na População 1 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	87
<b>Figura 15:</b> Correlograma dos 7 alelos analisados na População 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	89
<b>Figura 16:</b> Correlograma da média dos valores de I dos 7 alelos analisados na População 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	89

## ANEXOS

<b>Figura 17:</b> Correlogramas dos alelos individuais dos 3 locos polimórficos analisados na amostra de indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	128
<b>Figura 18:</b> Correlogramas dos alelos individuais dos 4 locos polimórficos analisados na População 1 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	129
<b>Figura 19:</b> Correlogramas dos alelos individuais dos 4 locos polimórficos analisados na População 2 de <i>Aspidosperma polyneuron</i> na Estação Ecológica dos Caetetus (Gália-SP). Campinas-SP, UNICAMP. 1997. ....	131

# ESTRUTURA GENÉTICA DE *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. ~ APOCYNACEAE (PEROBA ROSA) EM UMA FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL NO ESTADO DE SÃO PAULO

Autora: Helena Maria Maltez

Orientador: Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo da estrutura genética de duas populações naturais ( $P_1$  e  $P_2$ ) de uma espécie arbórea emergente, *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (peroba rosa), em uma floresta estacional semidecidual no interior do Estado de São Paulo. As duas populações foram amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, localizada nos Municípios de Gália e Alvinlândia, de 2.179 ha, administrada pelo Instituto Florestal.

Nas duas populações analisadas, distantes aproximadamente 3,5 km uma da outra, foram amostrados 63 e 53 indivíduos, respectivamente. A área ocupada por estes indivíduos é de cerca de 8 ha em ambas as populações, resultando em densidades de 7,9 e 6,6 indivíduos/ha. A distribuição dos indivíduos, estimada pelo método do vizinho mais próximo, de CLARK e EVANS (1954), foi agregada para  $P_1$  e aleatória para  $P_2$ . Foram discutidas as implicações desses padrões de estrutura populacional, assim como da distribuição diamétrica dos indivíduos, sobre a estrutura genética dessas populações.

A caracterização genética foi realizada através de marcadores alozímicos, revelados a partir de eletroforese em gel de amido (penetrose). Foram utilizados 7 sistemas enzimáticos (LAP, PGI, MDH, PER, 6-PGDH e SKDH), totalizando 8 locos, para os indivíduos adultos; e 5 sistemas enzimáticos (LAP, PGI, MDH, PER e PGM), totalizando 6 locos, para os indivíduos jovens.

Para as populações de indivíduos adultos, foram estimadas as diversidades genéticas entre e dentro das populações, o fluxo gênico, a adequação das frequências genotípicas ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, os índices de fixação de Wright e feita a análise da distribuição espacial dos genótipos dentro

das populações. Estas mesmas estimativas, com exceção do fluxo gênico, foram obtidas para uma amostra de indivíduos jovens da População 1 de adultos.

Alta diversidade genética foi encontrada para adultos e jovens. Para as populações de indivíduos adultos os resultados foram (primeiro valor =  $P_1$  / segundo valor =  $P_2$ ): heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_e$ ) = 0,237/0,239; heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) = 0,243/0,270; porcentagem de locos polimórficos (0,95) ( $\hat{P}$ ) = 50,0%/50,0%, e o número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) = 2,00/1,88. O resultado para a amostra de indivíduos jovens foi:  $\hat{H}_e = 0,242$ ;  $\hat{H}_o = 0,321$ ;  $\hat{P} = 50,0\%$  e  $\hat{A} = 1,67$ .

As populações de indivíduos adultos apresentaram, respectivamente, 2 e 3 locos com desvio em relação às expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto que para a amostra de indivíduos jovens, todos os locos diferiram significativamente das expectativas do equilíbrio, no sentido de um excesso de heterozigotos com  $\hat{F} = -0,326$ . Maior excesso de heterozigotos foi encontrado nos indivíduos jovens do que nos adultos, indicando que o sistema de cruzamento não explica por si só o padrão encontrado, havendo atuação de outras forças evolutivas. As estimativas das taxas de fertilização cruzada aparente ( $\hat{t}_a$ ), obtidas a partir do índice de fixação, foram de 0,82 para  $P_1$  e 0,90 para  $P_2$ , sugerindo tratar-se de uma espécie preferencialmente alógama.

A maior parte da diversidade foi encontrada dentro das populações ( $\hat{F}_{ST} = 0,061$ ,  $\hat{G}_{ST} = 0,060$ ). O fluxo gênico encontrado ( $\hat{N}m = 0,98$ ) revelou-se amplo o suficiente para não permitir a divergência entre elas, mas não é tão intenso a ponto de torná-las semelhantes.

O estudo da estrutura genética espacial foi feito através de análise de autocorrelação espacial, utilizando-se o índice I de Moran. Os resultados sugerem uma distribuição espacial aleatória dos genótipos, tanto para as populações de indivíduos adultos, quanto para a amostra de indivíduos jovens.

Os resultados encontrados para os parâmetros de estrutura populacional e genéticos indicam que a peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*) é uma espécie que apresenta grande potencial para uso sob manejo sustentado.

São apontados novos estudos a serem desenvolvidos com base nos resultados obtidos.

# GENETIC STRUCTURE OF *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. - APOCYNACEAE IN A TROPICAL FOREST OF THE STATE OF SÃO PAULO

Author: Helena Maria Maltez

Adviser: Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama

## SUMMARY

Two populations ( $P_1$  and  $P_2$ ) of an emergent tropical tree, *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg., were surveyed in a tropical forest in the State of São Paulo State with the objective of studying its genetic structure. Field work was conducted at the Caetetus Ecological Station, a 2.179 ha facility managed by the State of São Paulo's Forest Institute, located in Gália and Alvinlândia counties.

The distance between the two populations is 3,5 km. The sample size was 63 and 53 trees for  $P_1$  and  $P_2$  respectively. They occupied an 8 ha area each, resulting in a density of 7,9 and 6,6 trees/ha. The patterns of the spatial distribution were aggregate for  $P_1$  and random for  $P_2$ , according to nearest neighbor method of CLARK and EVANS (1954). The genetic structure implications of those structural parameters and the diametrical distribution were discussed.

The genetic characterization was performed using allozymic markers, revealed from starch gel electrophoresis (penetrose). Seven enzymatic systems (LAP, PGI, MDH, PER, 6-PGDH e SKDH), resulting in 8 genetic loci, were used to study adult populations. Five enzymatic systems (LAP, PGI, MDH, PER, 6-PGDH e SKDH), resulting in 6 genetic loci, were used to study young individuals.

Genetic variability and its distribution within and between populations, deviates from Hardy-Weinberg equilibrium, Wright's F-statistics, gene flow and spatial genetic structure analysis were obtained for the two populations. All the parameters, with exception of gene flow, were estimated for a young individual sample plotted in the  $P_1$  population.

Both adult populations and young sample showed a high level of genetic diversity. The results for adult trees were (first value =  $P_1$  / second value =  $P_2$ ): expected heterozigosity ( $\hat{H}_e$ ) = 0,237/0,239;

observed heterozygosity ( $\hat{H}_o$ ) = 0,243/0,270; percentage of polymorphic loci ( $\hat{P}$ ) = 50,0%/50,0% and mean number of alleles per locus ( $\hat{A}$ ) = 2,00/1,88. The results for the young individual sample, were:  $\hat{H}_e$  = 0,242;  $\hat{H}_o$  = 0,321;  $\hat{P}$  = 50,0% and  $\hat{A}$  = 1,67.

Adult populations presented two and three loci, respectively, in Hardy-Weinberg equilibrium and for young individual sample all loci deviates significantly from the equilibrium expectations. An excess of heterozygous genotypes was detected for the last category ( $F = -0,326$ ). The excess of heterozygous genotypes was higher for young individuals than for adults, indicating the occurrence of additional events involved in the mating system. The mean apparent outcrossing rate ( $\hat{t}_a$ ) estimated from the inbreeding coefficient was 0,82 for  $P_1$  and 0,90 for  $P_2$ , suggesting that *A. polyneuron* is a cross-fertilizing species.

Most of the genetic variation was found within populations ( $\hat{F}_{ST} = 0,061$ ,  $\hat{G}_{ST} = 0,060$ ). The gene flow between populations ( $\hat{Nm} = 0,98$ ) is sufficiently high to prevent the genetic differentiation, but is not sufficient to make them identical.

The spatial genetic structure was characterized through spacial autocorrelation analysis using Moran's index (**I**). The results showed a random spatial distribution of genotypes for both adult populations and young individual sample.

The results obtained for the structural and genetic parameters of the studied populations indicates that *Aspidosperma polyneuron* is a potential species to be used under sustainable management.

Research needs are indicated.

# CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

## 1. APRESENTAÇÃO

A Mata Atlântica, que originalmente ocupava uma área de 108.500.000 ha, abrangendo 16 Estados Brasileiros, apresenta hoje somente 8,8% de sua área original (9.564.100 ha). O Estado de São Paulo, por sua vez, que apresentava no início do século XIX uma cobertura florestal em torno de 16.175.000 ha, apresentava em 1992 somente 4.320.760 ha (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 1992), ou 7,16% de sua área original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 1993). Somente entre 1985 e 1990, houve um desmatamento de 3,44% (61.720 ha) em relação à cobertura florestal existente em 1985.

Da área remanescente no Estado de São Paulo, 3.440.800 ha apresentam-se sob a forma de floresta contínua, localizada na encosta atlântica ao sudeste do Estado e formada basicamente por floresta pluvial, enquanto que, no interior do Estado, a floresta ocupa aproximadamente 876.000 ha (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 1992). Nesta região, a intensa ocupação do solo para a agropecuária foi responsável pela diminuição drástica da cobertura florestal, que hoje se encontra confinada a pequenos fragmentos em propriedades particulares, sujeitos a todo tipo de perturbação, e a alguns poucos fragmentos grandes sob tutela do Estado, que ainda são capazes de manter intactas as condições ecológicas originais. Segundo os dados obtidos pela FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE (1993), no período entre 1985 e 1990, 55,80% da área total desmatada no Estado de São Paulo ocorreu no interior do Estado.

Vários estudos florísticos e fitossociológicos têm sido desenvolvidos nos últimos anos na floresta do interior do Estado de São Paulo, conhecida como floresta estacional semidecidual (IBGE, 1991) em fragmentos de diversos tamanhos (NOGUEIRA, 1976; CAVASSAN et al., 1984; CATHARINO, 1989; PAGANO e LEITÃO FILHO, 1987; MORELLATO, 1991, entre outros). Tais estudos têm evidenciado uma riqueza florística maior do que se supunha nessas florestas residuais, com um número de espécies arbóreas e arbustivas variando de 130, como na mata de Santa Genebra (Campinas), de 251,8 ha (MORELLATO, 1991) a 201, como em uma floresta de 230 ha em Rio Claro (PAGANO e LEITÃO FILHO, 1987).

Entretanto, muito pouco se conhece sobre a estrutura genética das espécies aí existentes, ou seja, a variabilidade genética entre e dentro de suas populações. BRUNE (1975) destaca que grande parte da diversidade genética, principalmente das florestas do interior do Estado, pode ter sido extinta sem sequer ter sido estudada. Este estudo é fundamental, pois perdas de variabilidade genética podem levar à redução da habilidade de populações se adaptarem a mudanças no ambiente (FISHER, 1958 e BEARDMORE, 1983). Por outro lado, o manejo de populações naturais, concomitante com a conservação dos recursos genéticos, exige o conhecimento de como a variabilidade está distribuída nas populações e quais as características do ambiente ou das espécies que influenciam essa distribuição (HAMRICK, 1983). Assim, a conservação e o manejo de espécies arbóreas tropicais exigem que sejam mantidas não somente a estrutura demográfica das populações, o que é essencial, mas também níveis adequados de variabilidade genética nos indivíduos reprodutivos, para que haja possibilidade de geração de recombinantes nas gerações posteriores. Isto é fundamental para a manutenção da integridade genética e demográfica das espécies, e a perpetuação desse recurso a longo prazo.

Não é possível, a princípio, analisar a estrutura genética de todas as espécies arbóreas existentes na floresta estacional semidecidual. Pode-se tentar, entretanto, conforme propõe KAGEYAMA e GANDARA (1993), estabelecer alguns modelos para espécies que apresentem as mesmas características de história vital, mesmo tipo de estrutura demográfica e tipo de comportamento mediante perturbação. HAMRICK (1983) destaca que estas características podem determinar diversos padrões de estrutura genética. Conseqüentemente, deverão ser diferentes as estratégias para a conservação da variabilidade genética de espécies com característica de história vital diferentes. Poderíamos especular, por exemplo, que as espécies *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (peroba rosa), *Astronium graveolens* Jacq. (aroeira), *Cariniana estrellensis* (Raddi) O. Kuntze (jequitibá branco), *C. legalis* (Mart.) O. Kuntze (jequitibá vermelho), *Gallesia gorazema* (Vell.) Moq. (pau d'algo), *Myrocarpus frondosus* Fr. All. (cabreúva-parda), que compõe o dossel ou participam do estrato emergente de florestas estacionais semidecíduais, são secundárias tardias (CARVALHO, 1994), apresentam polinização por pequenos insetos e dispersão de sementes pelo vento, além de não apresentarem dormência de sementes, devido possuírem estas características em comum, possam apresentar padrões de distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações semelhantes, o que deve ser investigado.

Visando avaliar a aplicabilidade de tal modelo, foi eleita a espécie *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (peroba rosa) que, devido ao seu elevado valor comercial, sofreu intensa exploração seletiva, sem qualquer critério para o seu manejo e conservação. Esta exploração tradicional, feita sem reposição ou conservação adequadas, pode ter ocasionado a diminuição da variabilidade genética entre e dentro de suas populações. Por outro lado, *A. polyneuron* tem não só importância econômica, mas também uma grande importância ecológica. Devido ao seu porte emergente, esta espécie é uma das que fornece estrutura à floresta, permitindo que os outros estratos se desenvolvam. Por outro lado, suas flores, polinizadas provavelmente por mariposas e/ou outros pequenos insetos (MORELLATO, 1991), fornecem alimento para a manutenção desses importantes polinizadores.

O Capítulo II deste trabalho apresenta os resultados obtidos no estudo genético de duas populações naturais desta espécie, analisadas através de marcadores alozímicos.

Apesar de terem surgido vários trabalhos enfocando a estrutura genética de espécies arbóreas tropicais nos últimos anos (Tabela 22 dos ANEXOS), são muito poucos os trabalhos empíricos ou teóricos que integram as dinâmicas genética e demográfica visando avaliar o efeito relativo das forças evolutivas na estrutura genética de populações que se desenvolvem em condições naturais (ALVAREZ-BUYLLA et al., 1996). Um dos poucos trabalhos publicados que tem esse enfoque é o dos autores acima citados e que aborda os diversos estádios de desenvolvimento de *Cecropia obtusifolia* (em Los Tuxlas - México). Neste trabalho foram analisadas sementes colhidas nas matrizes, chuva de sementes, banco de sementes, plântulas, jovens e adultos. Tal abordagem foi feita no Capítulo II do presente trabalho, através do levantamento de dados relativos à estrutura das populações estudadas e do estudo da variabilidade genética de uma parcela indivíduos jovens de *A. polyneuron*.

Para a maioria das espécies arbóreas tropicais preferencialmente alógamas estudadas até o momento, a maior parte da variabilidade genética tem sido encontrada dentro das populações (Tabela 23 dos ANEXOS). A forma como a variabilidade encontra-se distribuída nesta escala torna-se uma questão importante para a compreensão da movimentação dos alelos nestas populações. Esta questão foi abordada no Capítulo III, através da análise de autocorrelação espacial dos genótipos dentro de duas populações naturais de *A. polyneuron*.

Por último, é importante destacar que a conservação efetiva da variabilidade genética de populações de plantas tem como premissa a continuidade do processo evolutivo, o que só se dá em seu habitat natural (FAO, 1984; NAMKOONG, 1992). Portanto, a abordagem conservacionista deve

envolver sempre a conservação *in situ*. No caso de espécies como *A. polyneuron*, que não se desenvolvem nos estágios iniciais a pleno sol (CARVALHO, 1994), a conservação da estrutura e fisionomia da floresta é fundamental para que seja possível a manutenção e perpetuação de suas populações naturais. A estratégia envolvendo a conservação *in situ* pode ser complementada pela conservação *ex situ* e diminuição do impacto sobre as florestas naturais, através do fomento das atividades de plantio de essências florestais nativas de elevado valor comercial, em sistemas de consorciação ou sistemas agroflorestais. A questão da conservação e manejo de *A. polyneuron* será tratada no Capítulo IV.

## 2. OBJETIVOS

- a) Levantar dados de estrutura populacional de *A. polyneuron* na Estação Ecológica dos Caetetus e discutir as suas implicações sobre a estrutura genética desta espécie.
- b) Definir o protocolo, ou seja, a metodologia para obtenção dos marcadores alozímicos utilizados no presente trabalho.
- c) Estimar a diversidade genética dos indivíduos adultos de duas populações de *A. polyneuron* na Estação Ecológica dos Caetetus e verificar a distribuição da diversidade entre e dentro destas populações, através de marcadores alozímicos.
- d) Estimar a diversidade genética em uma amostra de indivíduos jovens coletados em uma das populações estudadas, através de marcadores alozímicos.
- e) Avaliar a distribuição espacial dos genótipos dentro das duas populações amostradas, visando detectar a presença ou não de estrutura que indique agregação de indivíduos geneticamente semelhantes.
- f) Discutir as implicações dos resultados obtidos nos itens anteriores sobre o manejo e conservação de *A. polyneuron*.

### 3. *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (PEROBA ROSA)

A espécie *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) pertence à família Apocynaceae. WOODSON (1951) considerou como pertencentes ao gênero *Aspidosperma* Mart. & Zucc. 52 espécies. MARCONDES-FERREIRA NETO (comunicação pessoal), que realizou recentemente uma revisão do gênero, considera como pertencentes à *Aspidosperma* 43 espécies. Estas ocorrem em todos os tipos de vegetação, estendendo sua distribuição desde o México até a Argentina, sendo a maioria brasileira; destas, numerosas espécies de *Aspidosperma* fornecem madeiras amarelas, amareladas, ou amarelo-rosadas, com os nomes locais de pereiro, peroba, guatambu, perobinha, entre outros; todas as espécies são ricas em alcalóides (RIZZINI, 1990). MARCONDES-FERREIRA NETO (1988) destaca que a diversidade e abundância destes alcalóides tem resultado em um aumento do interesse pelo gênero *Aspidosperma*. Segundo SCHMUTZ (1960, citado por MARCONDES-FERREIRA NETO, 1988), neste grupo de espécies pelo menos 157 tipos de alcalóides já foram isolados e identificados. Este mesmo autor acrescenta que os alcalóides de *A. polyneuron*, por exemplo, podem ser usados na recuperação de lesões produzidas pela hanseníase.

Trata-se de uma árvore perenifólia, comumente com 15 a 25 m de altura e 50 a 100 cm de DAP (Diâmetro à Altura do Peito), podendo atingir até 45 m de altura e 200 cm ou mais de DAP. Seu tronco é cilíndrico, reto ou levemente tortuoso. O seu fuste é retilíneo, geralmente medindo até 20 m, atingindo às vezes 30 m, o que possibilita a extração de toras de mais de 10 m sem nós. Sua copa alta, corimbiforme, densa, característica, facilita sua identificação no meio das demais árvores da floresta. Sua casca tem espessura de 20 a 50 mm. A casca externa é cinzenta a castanha-grisácea, profundamente fissurada, formando aletas agudas. A casca interna é rosa escura, característica, à qual se deve o seu nome vulgar. Apresenta folhas simples, alternas, variáveis quanto à forma (obovadas a elíptico-oblongas) e ao tamanho, tendo em média 8 cm de comprimento por 3 cm de largura. As nervuras secundárias são numerosas e quase paralelas entre si, com um padrão característico que facilita o seu reconhecimento. Latescente, apresenta exsudação de látex ao ser arrancada uma folha. Tem inflorescência terminal, dicásio composto modificado, com cerca de 3 cm, difícil de ser observada na floresta. Suas flores são branco-amareladas a creme, com cerca de 3 mm. Os estames apresentam-se inseridos no quarto superior do tubo da corola, com anteras ovais, de cerca de 1 mm, acuminadas. Tem ovário ovóide, com cerca de 1 mm, densamente pubérulo. O fruto é um folículo oblongo a obovado,

séssil, achatado, lenhoso, castanho com 2,5 cm a 6 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura, densamente coberto por lenticelas. Apresenta uma a quatro sementes por fruto. A semente possui ala lateral basal e é provida de núcleo seminal basal, com 2 a 4 cm de comprimento por 10 mm de largura (CARVALHO, 1994 e MARCONDES-FERREIRA NETO, 1988).

A zona de ocorrência original de *A. polyneuron* é ampla, do centro e extremo sul da Bahia e norte do Espírito Santo (onde é muito rara), passando pelo norte e noroeste da Venezuela, norte da Colômbia, leste do Paraguai, Peru, chegando à Argentina (extremo nordeste) (RIZZINI, 1990 e CARVALHO, 1994). No Brasil, esta área abrange o sul de Goiás, na Zona da Mata e centro de Minas Gerais, sul do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, norte e noroeste do Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (Figura 1). MARCONDES-FERREIRA NETO (1988) destaca o padrão disjunto de sua distribuição, com ocorrência de um grupo nas regiões nordeste e sudeste do Brasil e de outro grupo no norte da América do Sul (Colômbia e Venezuela) e também nas Antilhas, na ilha de Hispaniola (Haiti e República Dominicana). Atualmente, em função da intensa exploração da espécie e da destruição e fragmentação dos ecossistemas onde ela ocorre, a sua área de ocorrência no Brasil encontra-se significativamente reduzida (IPEF/EMBRAPA, 1981). Segundo RIZZINI (1990), em alguns Estados como o Rio de Janeiro e Minas Gerais, a mesma já é dificilmente encontrada.

Apesar de ser ainda encontrada em alta densidade em algumas florestas, em IPEF/EMBRAPA (1981) há a preocupação de que, devido sua importância na construção civil, esta espécie corra sério risco de extinção. CARVALHO (1994) salienta ainda que, devido ao perigo de extinção dessa espécie, é necessário, com urgência, um programa de conservação genética para *A. polyneuron*.

Ocorre em altitudes que vão de 80 a 1.000 m e em regiões com precipitação média anual de 1.100 a 2.500 mm. Nas regiões em que ocorre, o regime pluviométrico é uniforme (no centro-sul do Paraná) e, principalmente, estacional (nas demais regiões), com chuvas concentradas no verão e estação seca desde pouco pronunciada (Paraná e sul da Bahia) até com 5 meses de duração e déficit hídrico moderado (São Paulo e centro de Minas Gerais). A temperatura média anual da sua área de ocorrência varia de 16 a 23°C e os tipos climáticos (Köppen) podem ser do tipo Af, Aw, Cfa, Cfb, Cwa ou Cwb. Ocorre em solos bem drenados e de textura franco-arenosa a argilosa (CARVALHO, 1994).

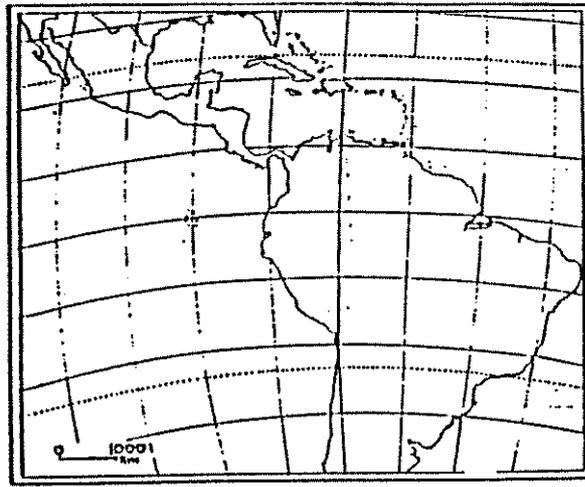
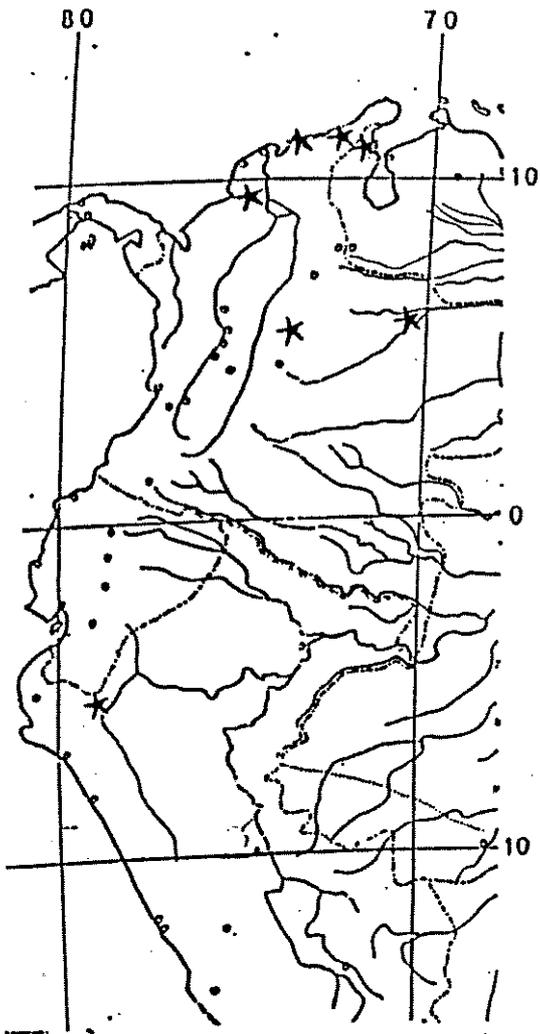
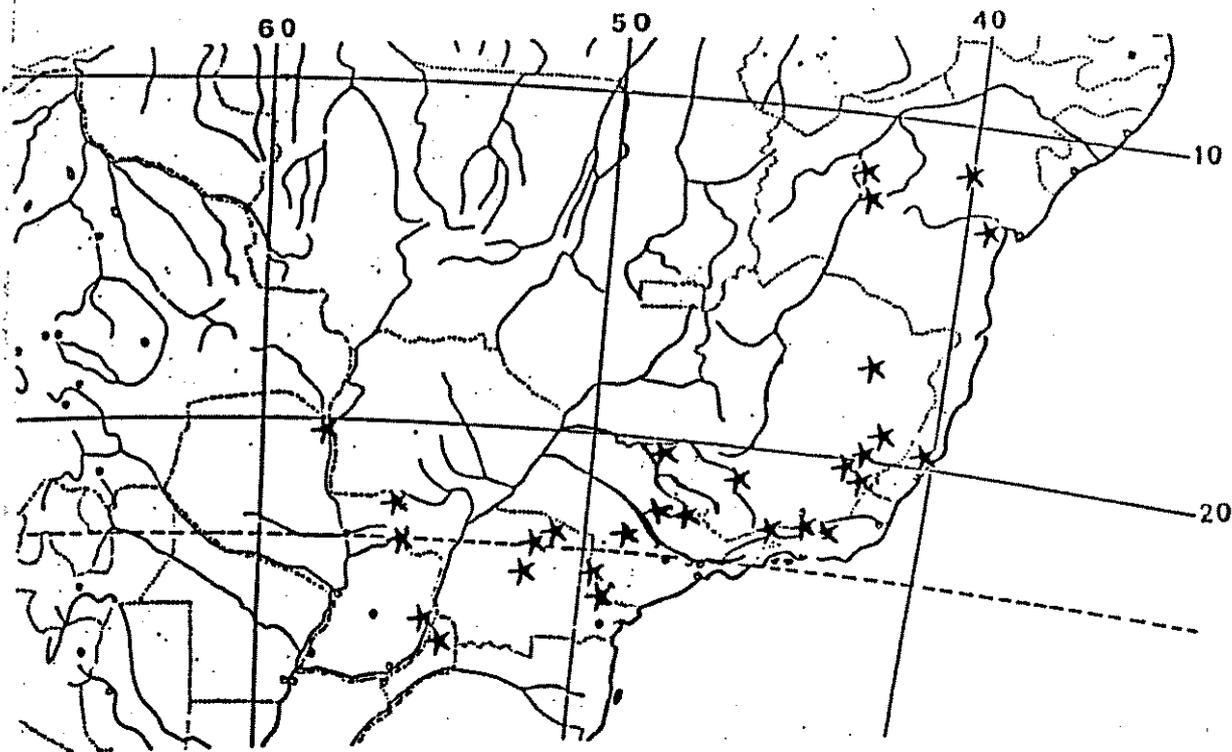


Figura 1: Distribuição geográfica de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) - ★. Extraído de MARCONDES-FERREIRA NETO (1988)



*A. polyneuron* é uma espécie característica da floresta estacional semidecidual, na formação submontana. A floresta situada em solos provenientes do Arenito Caiuá, do oeste e noroeste do Paraná e do sudeste de Mato Grosso do Sul, era visivelmente dominada por *A. polyneuron*, que perfazia aproximadamente 30 a 60% da cobertura do estrato emergente (LEITE et al., 1986). Nas florestas situadas em solos de terra roxa no norte do Paraná, *A. polyneuron* desempenhava papel relevante, dominando de forma evidente, constituindo, não raro, de 60 a 80% da cobertura do estrato emergente (KLEIN, 1985). Pode ser encontrada também: (a) na floresta estacional decidual; (b) em menor escala na floresta ombrófila mista (floresta de araucária) no sul do Paraná (GALVÃO et al., 1989); (c) na floresta ombrófila densa (floresta amazônica) no extremo noroeste de Mato Grosso (CHIMELO et al., 1976), (d) esporadicamente no pantanal (CARVALHO, 1994) e caatinga (MARCONDES-FERREIRA NETO, 1988).

Segundo INOUE (1983), *A. polyneuron* é uma espécie clímax ou umbrófila de sucessão tardia. Da mesma forma, BERNACCI (1992) e LORENZI (1992) consideram-na como pertencente ao mais avançado estágio sucessional de matas de planalto. TABANEZ (1995) a considera “tolerante” segundo classificação proposta por VIANA (1989), segundo a qual tais espécies são aquelas que têm sementes que não precisam de clareira para germinar, as plântulas podem crescer até o estágio adulto sem a presença de clareiras, mas não se reproduzem à sombra. Apresenta regeneração natural em vários estratos da floresta, chegando a formar densos “perobais”, o que permitiria, em tese, até 400 m<sup>3</sup> de peroba por alqueire (FACCHINI, 1970). É árvore longeva, podendo ultrapassar 1.200 anos de idade (CARVALHO, 1994).

TABANEZ (1995), estudando a estrutura de ecounidades em uma floresta estacional semidecidual do interior de São Paulo, encontrou *A. polyneuron* nas ecounidades capoeira baixa (a menos desenvolvida), capoeira alta e mata madura, com densidades respectivas de 15,42; 32,10 e 53,24 indivíduos/ha. Esta informação evidencia a presença desta espécie nos diversos estágios sucessionais da floresta, conforme indicado por CATHARINO (1989). Por outro lado, SCHLITTLER (1990) encontrou indivíduos de *A. polyneuron* nos três ecótopos por ele estudados na floresta da Reserva do Morro do Diabo (Teodoro Sampaio-SP), na baixada, na vertente e no topo de morro, que apresentavam fertilidade e umidade do solo, densidade de indivíduos arbustivo-arbóreos e acúmulo de serrapilheira diferenciados.

Nos levantamentos fitossociológicos realizados no Estado de São Paulo, *A. polyneuron* foi encontrada com densidade desde 7,46 até 42,46 indivíduos/ha (Tabela 1). Em casos extremos, pode apresentar alta densidade, tornando-se uma espécie comum, como verificado por RODRIGUES et al. (submetido) em Campinas (217 ind./ha). Apresenta, geralmente, um elevado valor de IVI, devido tanto ao grande número de árvores amostradas quanto ao elevado DAP dos indivíduos amostrados.

*Tabela 1: Densidade de Aspidosperma polyneuron (peroba rosa) encontrada em levantamentos fitossociológicos realizados em fragmentos florestais de diferentes tamanhos no Estado de São Paulo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Local	Área (ha)	Método*	Tamanho mínimo	Nº indivíduos amostrados	Densidade (ind./ha)	Posição (IVI)	Ref.**
Rio Claro	230	Q	fuste≥1,30m	17	7,45	16	1
Teodoro Sampaio	20.000	Q	DAP≥5cm	11	10,25	10	2
Campinas	10	C	DAP≥10cm	34	14,60	5	3
Atibaia	245	P	DAP≥4,8cm	7	16,66	48	4
Piracicaba	86	P	DAP≥5cm	36	26,85	11	5
Bauru	200	Q	DAP≥10cm	34	42,46	3	6
Campinas	251,8	P	DAP≥4,8cm	217	217	1	7

\* P-parcelas; Q-quadrantes; C-censo

- \*\* 1 - PAGANO e LEITÃO FILHO (1987)  
 2 - SCHLITTLER (1990)  
 3 - MATTHES et al. (1988)  
 4 - GROMBONE et al. (1990)  
 5 - TABANEZ (1995)  
 6 - MARTINS et al. (1984)  
 7 - RODRIGUES et al. (submetido)

Segundo a bibliografia, o florescimento de *A. polyneuron* ocorre entre setembro e dezembro em São Paulo (CARVALHO, 1994 e RIZZINI, 1990) e novembro e dezembro no Paraná (CARVALHO, 1994). MORELLATO (1991) destaca que a floração de *A. polyneuron* é marcadamente sazonal, ocorrendo entre os meses de setembro e novembro, ou seja, no início da estação úmida. Baseando-se na síndrome floral de *A. polyneuron*, MORELLATO (1991) sugere ser

sua polinização provavelmente realizada por mariposas. Tal síndrome é caracterizada pelo pequeno tamanho das flores, com coloração esbranquiçada e cheiro atraente.

Uma estratégia muito comum para garantir a polinização cruzada em espécies arbóreas tropicais é a autoincompatibilidade. BAWA (1974), por exemplo, estudando espécies arbóreas e arbustivas na Costa Rica, concluiu que 54% das espécies por ele estudadas apresentavam esse tipo de estratégia. Segundo SHEPHERD (comunicação pessoal), há uma grande possibilidade de *A. polyneuron* apresentar autoincompatibilidade. Este mecanismo já foi verificado em outras espécies de Apocynaceae, como por exemplo *Rauvolfia grandiflora* (LOPES, A.V.F., comunicação pessoal). Seria muito interessante a realização de estudos que verificassem se existe ou não esse mecanismo em *A. polyneuron*, pois é grande a implicação de um sistema de alogamia obrigatória sobre a estrutura genética de populações naturais, conforme será discutido no Capítulo II.

A frutificação, no Estado de São Paulo, ocorre, normalmente, no período de junho a agosto (RIZZINI, 1990), podendo se estender até novembro (CARVALHO, 1994). No Espírito Santo frutifica de julho a setembro, enquanto que no Paraná frutifica de julho a outubro. CARVALHO (1994) destaca que é comum haver anos sem frutificação, sendo produzida grande quantidade de sementes apenas a cada 2-4 anos. De fato, de 116 árvores amostradas, apenas 3 frutificaram (com poucos frutos) na área do presente estudo, durante o período de sua execução. Em plantios, floração e frutificação têm tido início aos 20 anos (CARVALHO, 1994).

A dispersão das sementes é feita pelo vento (anemocórica) (CARVALHO, 1994). Um quilo pode conter de 3.600 a 14.000 sementes da espécie (LORENZI, 1992), que germinam em aproximadamente 16 dias (RIZZINI, 1990). As sementes não apresentam dormência, perdendo a viabilidade em aproximadamente 6 meses, e a germinação varia de 35 a 70% (CARVALHO, 1994). A produção das mudas deve ser feita sob sombreamento (mesmo autor).

Apesar de sua grande importância econômica e ecológica, não existem estudos mais detalhados sobre a auto-ecologia de *A. polyneuron*.

Além de possuir madeira de boa qualidade, *A. polyneuron* tem apresentado um bom ritmo de crescimento em ensaios de campo (IPEF/EMBRAPA, 1981), o que demonstra seu potencial para cultivo, o que, por sua vez, proporcionaria uma diminuição da pressão sobre os remanescentes de floresta natural. Neste sentido, dados de estrutura e diversidade genética de suas populações naturais podem ser de grande valor para a coleta de sementes visando o plantio comercial.

O plantio a pleno sol não é recomendado, mesmo em solo fértil, podendo haver mortalidade de até 100% (CARVALHO, 1994). De fato, em povoamento puro experimental, GURGEL FILHO et al. (1992) obtiveram um crescimento lento para *A. polyneuron*. As médias para indivíduos de 19 anos foram de 7,1 cm de DAP e 8,17 m de altura, crescimento volumétrico médio anual de 2,47 m<sup>3</sup>/ha/ano de incremento com casca e área basal de 5,79 m<sup>2</sup>/ha. Ainda, os autores citados obtiveram altas taxas de bifurcação, só conseguindo fustes únicos e retos através de desrama artificial. Por outro lado, quando em consórcio com *Grevillea robusta* (em plantio concomitante a 2 x 2 m), os índices médios foram de 10,4 cm de DAP e 10,6 m de altura aos 16 anos de plantio (em plantio puro, aos 16 anos esses índices eram de 6,7 cm e 7,5 m, respectivamente), indicando ser o plantio misto o mais indicado para esta espécie (GURGEL FILHO et al., 1992). O plantio misto favoreceu também a formação de fuste sem ramificações. Existem, ainda, plantios experimentais bem sucedidos de *A. polyneuron* em consórcio com calabura (*Muntingia calabura*) (MORA, 1980) e *Peltophorum dubium* (KAGEYAMA et al., 1991). Não apresenta capacidade de rebrota após o corte (CARVALHO, 1994). *A. polyneuron* também pode ser estabelecida em vegetação matricial: em capoeira, capoeirão ou em floresta secundária, com a abertura de faixas e plantios em linhas.

A grande variação na produção de sementes entre árvores e entre anos (IPEF/EMBRAPA, 1981), as grandes amplitudes de variação para diâmetro (GURGEL FILHO et al., 1992), a ampla variação na taxa de germinação (CARVALHO, 1994), assim como os resultados obtidos por NOGUEIRA e SIQUEIRA (1976) testando diferentes procedências de *A. polyneuron*, fornecem indícios de uma elevada variabilidade genética dentro desta espécie. GURGEL FILHO et al. (1992) sugerem, inclusive, que o melhoramento genético é imprescindível para a viabilização econômica do plantio artificial de *A. polyneuron*. Neste caso, o uso de marcadores moleculares poderia ser de grande ajuda na seleção precoce de progênies, proporcionando a diminuição do ciclo de seleção em programas de melhoramento, o que pode ser muito interessante, principalmente por se tratar de uma espécie de ciclo muito longo.

Além do longo ciclo reprodutivo, outro problema associado ao melhoramento de *A. polyneuron* é a ocorrência generalizada de poliembrionia. O número de embriões por semente pode variar bastante, sendo que SOUZA e MOSCHETA (1992) encontraram uma amplitude de 1 a 21 embriões por semente, estudando indivíduos de 3 sítios diferentes no Paraná. Pode-se observar, em sementes de *A. polyneuron*, um embrião mais desenvolvido do que os demais. Da mesma forma como ocorre em citros, estudados

por BALLVE et al. (1991), a poliembrionia gera a questão de quantos e quais os embriões que são de fato oriundos de cruzamento e quais os clones nucleares e que, portanto, apresentam o mesmo genótipo dos genitores femininos. Através do uso de marcadores alozímicos pode ser possível a identificação das plântulas oriundas de cruzamento ainda no viveiro, gerando economia dos recursos necessários tanto para a transferência para o campo quanto para a manutenção de indivíduos que não apresentem interesse para o melhoramento (BALLVE et al., 1991). Esse método foi usado com sucesso por estes autores na identificação precoce de híbridos de citros.

Por outro lado, a identificação de embriões nucleares idênticos às plantas-mãe pode ser muito interessante para a propagação vegetativa de genótipos desejados. Ainda, a detecção dos embriões gerados por fecundação cruzada é imprescindível para a realização das análises alozímicas de progênes com o objetivo de estimar a taxa de cruzamento e o fluxo gênico em *A. polyneuron*.

Algumas informações preliminares sugerem ser esta espécie passível de um sistema de manejo sustentado, tais como a sua densidade relativamente elevada (ind./ha) em algumas florestas estacionais semidecíduais e intensa regeneração natural. Entretanto, além de estudos demográficos e genéticos adicionais para o estabelecimento de parâmetros seguros de manejo sustentado, medidas adicionais de manejo provavelmente deverão ser adotadas, tais como o controle de cipós e medidas adicionais visando favorecer o desenvolvimento de indivíduos jovens.

Ao objetivar a implementação de programas de manejo sustentado de espécies vegetais não se deve perder de vista, conforme sugerido por FANTINI et al. (1992), a perspectiva conservacionista destas espécies, o que pressupõe a manutenção da dinâmica demográfica e estrutura genética das populações naturais, bem como suas interações com as demais espécies do ecossistema. Neste sentido, segundo REIS (1996), é necessário que o número de indivíduos retirados a cada ciclo de corte seja repostado pela capacidade de reprodução e estabelecimento dos indivíduos novos da espécie, através do desenvolvimento dos indivíduos remanescentes e pela contínua reposição de propágulos para manutenção do banco de plântulas. REIS (1996) destaca, ainda, a necessidade da conservação de indivíduos reprodutivos que mantenham os níveis de variabilidade originais nas áreas sob manejo, garantindo a ressemeadura natural e ocorrência de recombinantes nas gerações subsequentes. A caracterização dos níveis de variabilidade e estruturação genética é, portanto, imperativa para a formulação de estratégias de manejo sustentado visando a sua conservação.

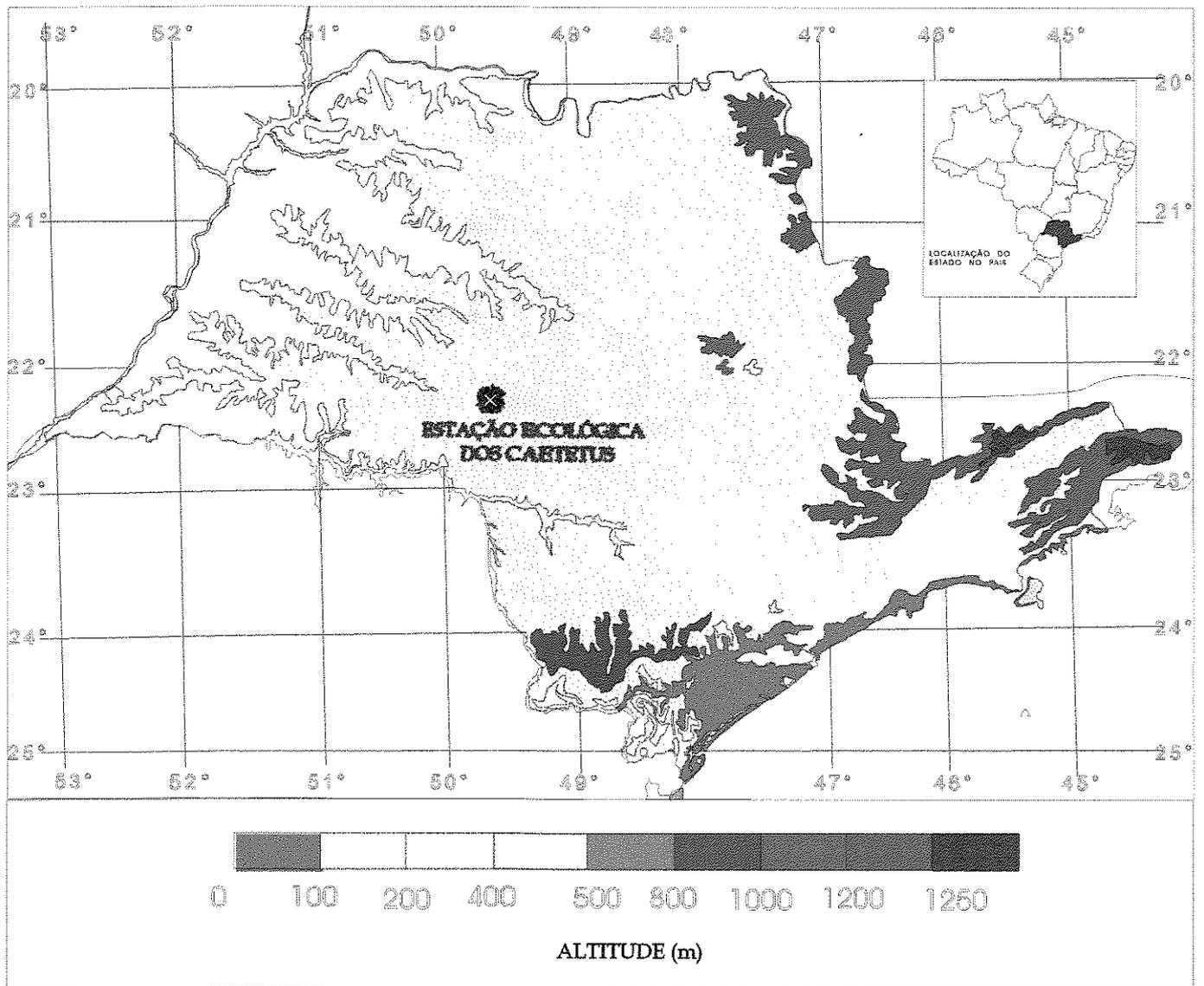
Conforme mencionado, *A. polyneuron* é uma espécie semi-heliófila, não ocorrendo em pastos ou terrenos abertos. No início de seu desenvolvimento necessita de sombreamento moderado, tornando-se tolerante à luz com o passar dos anos (LOPEZ et al., 1987). É provável que se beneficie da presença de clareira pequena dentro da floresta. Assim, a conservação de *A. polyneuron* implica na manutenção da estrutura e fisionomia da floresta.

## 4. LOCAL DE ESTUDO

As populações analisadas no presente estudo foram amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, administrada pelo Instituto Florestal de São Paulo, situada nos Municípios de Gália e Alvinlândia (SP), nas coordenadas geográficas 22°22' a 22°27' S e 49°40' a 49°43' W, com altitude variando entre 500 e 680 m (Figura 2). A Estação Ecológica, criada pelo Dec. 26.718 de 06/02/1987, tem uma área de 2.179 ha de floresta estacional semidecidual contínua, também chamada de floresta mesófila semidecídua por RIZZINI (1963) ou floresta estacional latifoliada subcaducifolia tropical pluvial por ANDRADE LIMA (1966), que também a denominou simplesmente de “mata mesófila”. A vegetação se encontra em bom estado de conservação e apresenta populações de *A. polyneuron* com baixos níveis de perturbação. Caetetus constitui um dos maiores remanescentes florestais no interior do Estado de São Paulo e um dos mais preservados.

O solo da Estação Ecológica dos Caetetus é do tipo Pve - Podzólico Vermelho - Amarelo, eutrófico com textura arenosa, altamente susceptível à erosão. O clima, segundo a classificação de Köeppen, é do tipo Cwa, ou seja, quente com inverno seco e com temperatura máxima anual de 30°C, mínima de 10°C e média de 20°C. A precipitação anual é de 1.480 mm e está concentrada nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, sendo maio e junho os meses mais secos do ano.

Figura 2: Localização da Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, área de floresta estacional semidecidual onde foram amostradas as duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) analisadas no presente estudo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997



## 5. POPULAÇÕES ANALISADAS

Na floresta da Estação Ecológica dos Caetetus, descrita anteriormente, foram delimitadas duas parcelas com área aproximada de 8 ha, distantes aproximadamente 3,5 quilômetros uma da outra (Figura 3). Em cada uma destas áreas, todos os indivíduos arbóreos de *A. polyneuron* com diâmetro à altura do peito (DAP) acima de 8 cm foram mapeados, etiquetados, medidos e tiveram folhas e ramos coletados. Estas duas amostras foram consideradas, no presente trabalho, como pertencentes a duas populações distintas de *A. polyneuron*. O mapeamento foi feito através da localização das árvores em relação às trilhas demarcadas na área, com o auxílio de trena e bússola.

Na primeira população, doravante chamada de População 1, foram marcados, mapeados e analisados 63 indivíduos, enquanto que na outra população, doravante chamada de População 2, foram marcados, mapeados e analisados 53 indivíduos.

Na População 1 foi estabelecida uma parcela de 50 x 15 m (750 m<sup>2</sup>), onde todos os indivíduos de *A. polyneuron* de qualquer tamanho, com exceção dos adultos, foram mapeados e coletadas para análise alozímica. Esta constituiu a amostra de indivíduos jovens. Nesta amostra foram encontradas e analisadas desde plântulas até indivíduos com 3m de altura, ou seja, indivíduos oriundos de diversos eventos reprodutivos.

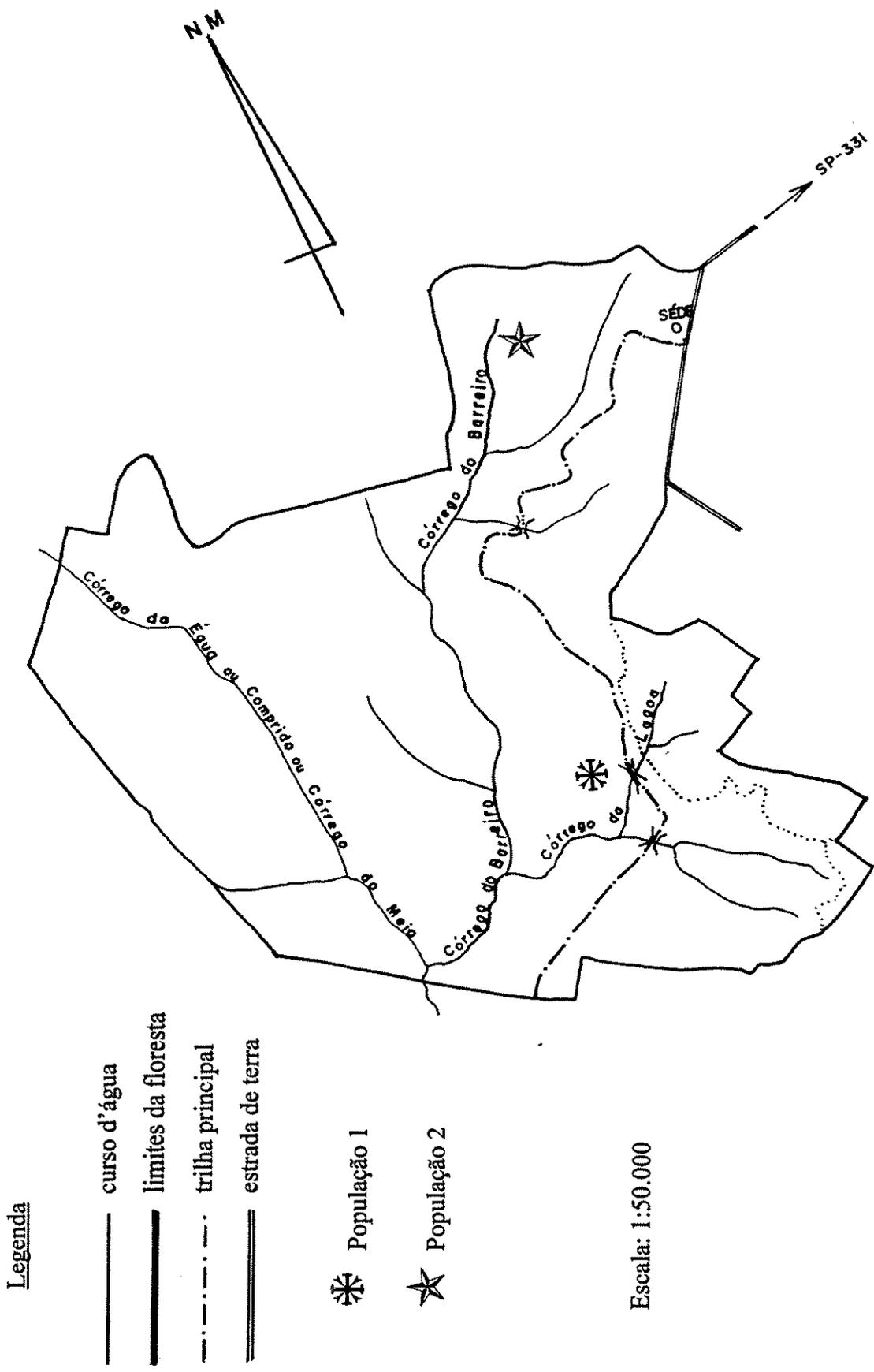


Figura 3: Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, com a localização das duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) analisadas no presente estudo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997

## CAPÍTULO II: ESTRUTURA GENÉTICA DE *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (PEROBA ROSA)

### 1. INTRODUÇÃO

A estrutura genética de espécies de plantas se refere à distribuição da variabilidade entre e dentro das populações e é resultado da ação de forças como seleção, migração, mutação e deriva genética (WHITLOCK, 1992). A compreensão do efeito dessas forças evolutiva na estrutura genética de populações naturais é um dos principais objetivos da biologia evolutiva moderna (WRIGHT, 1978; ENDLER, 1986). Essas quatro forças evolutivas interagem com o sistema de recombinação dos organismos sendo, portanto, responsáveis pela maneira como a variabilidade se distribui entre os diversos níveis hierárquicos (regiões, populações, indivíduos dentro de populações) (BARRETT e KOHN, 1991).

Dados empíricos e especulações teóricas evidenciam que a manutenção da variabilidade genética é importante para a adaptação de populações a alterações do ambiente (ELLSTRAND e ELLAM, 1993). WEIR (1990) acrescenta ainda que, além de ser necessária para as mudanças evolutivas futuras, a estrutura genética atual encontrada nas populações naturais pode fornecer evidências sobre os processos evolutivos do passado. Assim, a descrição da quantidade de variabilidade genética em populações e o estudo dos mecanismos que permitem a manutenção dessa variabilidade são objetivos básicos da genética de populações (NEI, 1987).

A variabilidade genética dentro de populações naturais é comumente avaliada a partir da diversidade genética e do nível de endogamia (índice de fixação). O conceito de diversidade genética utilizado neste trabalho será o proposto por NEI (1973) e se refere ao nível de heterozigotidade em uma população, obtido a partir das suas frequências alélicas (frequências gênicas). Segundo NEI (1975), as frequências alélicas constituem um parâmetro fundamental nos estudos de evolução, já que as mudanças genéticas em uma população são descritas pelas mudanças das frequências alélicas. Em populações naturais estas frequências são diretamente afetadas pelas forças evolutivas tais como mutação, migração, seleção natural e deriva genética (WEIR, 1990). O conceito de NEI (1973) de

diversidade genética tem sido utilizado por diversos autores (HAMRICK et al., 1981; HAMRICK e LOVELESS, 1986; GANDARA, 1996; REIS, 1996, entre outros) em estudos abordando a organização da variabilidade genética em populações naturais de plantas, inclusive espécies arbóreas tropicais. O índice de fixação, por sua vez, foi estimado através dos uso das estatísticas F de Wright.

Os marcadores alozímicos têm sido muito utilizados para obtenção dos dados necessários para a estimativa dos parâmetros que caracterizam a diversidade em populações naturais, ou seja, das frequências alélicas (trabalhos referenciados na Tabela 22 dos ANEXOS). Este método possui as seguintes vantagens: (i) marcadores alozímicos apresentam alelos com expressão codominante e as frequências alélicas podem ser calculadas sem a necessidade de se realizar cruzamentos (HAMRICK, 1983) (ii) padrão de herança mendeliana, ausência de pleiotropia e epistasia (WENDEL e WEEDEN, 1989), (iii) fácil e rápida execução, (iv) podem ser analisados indivíduos de qualquer idade e em qualquer estágio fenológico, (v) influência reduzida do meio e (vi) neutralidade seletiva. As desvantagens, por sua vez, se referem à (i) pequena amostragem de locos (com relação a marcadores DNA), (ii) toxicidade e custo dos reagentes utilizados (com relação aos marcadores morfológicos), além da questão do descarte dos produtos ao final da realização das análises, já que estes são altamente poluentes e (iii) não está claro a significância adaptativa das variações alozímicas. Este último aspecto foi discutido por REIS (1996).

Por outro lado, ISABEL et al. (1995), estudando uma espécie de conífera no Canadá (*Picea mariana*), obtiveram indicativos de que os resultados de diversidade genética obtidos via marcadores alozímicos podem corresponder àqueles obtidos via marcadores DNA do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

No presente trabalho, pretendeu-se abordar o estudo da variabilidade genética e sua distribuição entre e dentro de duas populações naturais de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) enfocando também alguns aspectos da estrutura populacional das populações. ALVAREZ-BUYLLA et al. (1996) destacam que poucos trabalhos têm tido esta perspectiva no estudo de espécies arbóreas tropicais.

### Hipóteses:

a) Considerando que: (i) *A. polyneuron* apresenta como polinizador(es) provável(eis) mariposas e/ou pequenos insetos que podem apresentar vôo longo, assim como dispersão anemocórica realizada na seca, quando a semidecuidade da floresta permite que as sementes alcancem longas distâncias e (ii) trata-se de uma espécie hermafrodita com provável polinização cruzada; tem-se como primeira hipótese que o nível de diversidade genética em populações naturais de *A. polyneuron* é elevado, encontrando-se, principalmente, dentro das populações, com pouca diferenciação entre populações.

b) Considerando que (i) há uma drástica diminuição no tamanho populacional entre os estádios de plântula/jovem e adulto, podendo ocorrer alteração nas frequências alélicas nesse processo, (ii) o padrão encontrado para a maioria das espécies arbóreas já estudadas é de um maior índice de fixação nas progênes do que nos indivíduos adultos; tem-se como segunda hipótese que o nível de heterozigosidade observada dentro da amostra de indivíduos jovens de *A. polyneuron* deve ser menor do que o encontrado para os indivíduos adultos.

## 2. OBJETIVOS

a) levantar dados de estrutura populacional tais como densidade, distribuição espacial, e distribuição diamétrica para duas populações de *A. polyneuron* amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP;

b) adequar a metodologia para obtenção de marcadores alozímicos para a espécie em estudo (*A. polyneuron*);

c) Estimar a diversidade genética nas duas populações de indivíduos adultos de *A. polyneuron* acima citadas, assim como a distribuição da variabilidade entre e dentro dessas populações.

d) Estimar a diversidade genética em uma amostra de indivíduos jovens de uma das populações de *A. polyneuron* analisadas;

e) Relacionar as informações de diversidade e estrutura genética obtidas com os dados de estrutura populacional de *A. polyneuron*.

## 3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

### 3.1 Estrutura Populacional

#### 3.1.1 *Densidade e Distribuição Espacial*

Segundo HUTCHINGS (1986), a densidade e a distribuição espacial de plântulas em uma população depende: (i) da distribuição das plantas matrizes produtoras de sementes; (ii) do padrão de chuva de sementes da espécie em torno de cada planta matriz, o que é influenciado pela ação dos vetores de dispersão de sementes; (iii) da abundância e comportamento dos herbívoros e (iv) da disponibilidade de sítios de germinação adequados. A densidade e estrutura espacial dos indivíduos adultos, por sua vez, refletem o padrão de distribuição destas plântulas e a influência dos fatores que causam a sua mortalidade (HUTCHINGS, 1986).

Ainda, segundo a hipótese de JANZEN (1970), um dos principais fatores responsáveis pelo padrão de distribuição espacial nos indivíduos adultos é o fato de que, como a maioria das sementes é depositada próximo à árvore-mãe, é maior nesta região a mortalidade devido ao ataque de herbívoros e patógenos. O sucesso no estabelecimento das plantas ocorre, portanto, distante da árvore-mãe. Este modelo geraria uma distribuição aleatória, com os indivíduos ocorrendo em baixa densidade em florestas naturais. Entretanto, HUTCHINGS (1986) destaca que padrões totalmente aleatórios de distribuição espacial dos adultos dentro de populações de plantas são raros na natureza, sendo esperados padrões de distribuição agregados para a maior parte das espécies de plantas.

Segundo MURAWSKI e HAMRICK (1991), a densidade populacional deve ter um papel determinante sobre o comportamento dos polinizadores, apresentando efeito direto sobre a estrutura reprodutiva destas espécies, e, conseqüentemente, sobre a sua estrutura genética. LEPSCH-CUNHA (1996) destaca ainda que, além da densidade dos indivíduos, a densidade de florescimento das árvores dentro da população também pode afetar as distâncias entre os parentais potenciais e o número deles disponíveis no tempo. A densidade de florescimento diz respeito ao número de árvores em florescimento simultâneo e que, portanto, apresentam potencial para cruzar entre si. Segundo

MURAWSKI e HAMRICK (1991), diversos parâmetros populacionais podem estar associados à densidade de florescimento, tais como endogamia, fluxo gênico e tamanho efetivo populacional.

Um fator que afeta diretamente a densidade de florescimento é a reprodução supra-anual, que, por sua vez, é muito comum em espécies arbóreas de florestas estacionais semidecíduais. Conforme dados de MORELLATO (1991), das 89 espécies arbóreas estudadas por esta autora na Reserva de Santa Genebra em Campinas-SP, 14 não frutificaram nos 3 anos de estudo dessa vegetação. Na Estação Ecológica dos Caetetus, as populações de *A. polyneuron* analisadas no presente estudo apresentaram poucos indivíduos florescendo durante o período do presente trabalho (observação pessoal).

MURAWSKI et al. (1990) encontraram diferenças significativas nas taxas de fecundação cruzada de *Cavanillesia platanifolia* em função da taxa de florescimento de árvores vizinhas. Ainda, diversos trabalhos com espécies arbóreas tropicais, tais como os de MURAWSKI et al. (1990), MURAWSKI e HAMRICK (1991 e 1992), GANDARA (1996) e REIS (1996), têm mostrado heterogeneidade nas frequências alélicas entre pólen e óvulo, indicando ocorrência de cruzamentos não aleatórios. Os padrões de densidade e distribuição espacial dos indivíduos adultos, sincronia de florescimento e supra-anuidade (que afetam o número de indivíduos em florescimento sincrônico e a distância entre os mesmos a cada evento reprodutivo) devem ter, portanto, influência marcante sobre o padrão de reprodução de espécies tropicais.

### **3.1.2 Distribuição de Tamanho**

Segundo DAUBENMIRE (1968, citado por MARTINS, 1991), em uma comunidade climática espera-se encontrar uma série completa de classes de tamanho para cada uma das espécies que compõem o ecossistema, posto que, para cada planta que morre ou envelhece, uma outra, imediatamente mais nova, deve estar disponível para substituí-la. Quando uma série é interrompida ou truncada, o ciclo de vida não está sendo completado e a espécie, geralmente, não pode ser considerada como em equilíbrio no ambiente. Portanto, populações em equilíbrio deveriam apresentar histogramas de frequência de classes de diâmetro como uma série geométrica decrescente (MARTINS, 1991). Se este modelo representar a realidade, uma menor frequência nas classes inferiores deve indicar problemas na regeneração, tais como: deficiência na polinização, condições inadequadas para o estabelecimento de plântulas e depressão endogâmica.

Este não parece ser, entretanto, o padrão predominante em populações naturais de espécies arbóreas tropicais longevas, principalmente em espécies que se apresentam naturalmente em baixa densidade (espécies raras) ou com densidade intermediária, conforme será discutido adiante.

Em populações de plantas, a sobreposição de gerações através da existência concomitante de indivíduos reprodutivos de diversas classes de tamanho (diversas idades) pode ter importantes implicações sobre a estrutura genética dessas populações, permitindo fluxo gênico entre indivíduos que não se cruzariam caso não houvesse tal sobreposição.

## **3.2 Estrutura Genética de Populações Naturais**

### ***3.2.1 Variabilidade Genética e sua Distribuição Entre e Dentro de Populações Naturais***

Conforme já mencionado, estudos enfocando a estimativa e compreensão da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais (estrutura genética) são fundamentais para o entendimento dos mecanismos de especiação em florestas tropicais e conservação dos recursos genéticos (BUCKLEY et al., 1988).

Os primeiros estudos sobre a variabilidade genética de espécies florestais através de marcadores alozímicos, foram feitos na década de 70, com espécies de florestas temperadas (coníferas), tais como os de RUDIN (1974), FOWLER e MORIS (1977), LUNDKVIST e RUDIN (1977) e YEH e O'MALLEY (1980).

Em florestas tropicais, o início de tais estudos se deu na Malásia (GAN et al., 1977), em florestas de Dipterocarpaceas. Diversos estudos, em diferentes formações florestais, então se seguiram, principalmente na América Central (HEYWOOD & FLEMING, 1986; HAMRICK e LOVELESS, 1986; HAMRICK e MURAWSKI, 1991; EGUIARTE et al., 1992; PÉREZ-NASSER et al., 1993 e HALL et al., 1994, entre outros). Na América do Sul, poucos trabalhos foram desenvolvidos até o momento, como por exemplo os de HILL et al., 1978; O'MALLEY et al., 1988; HARRITT, 1991; PAIVA, 1992; REIS, 1996; LEPSCH-CUNHA, 1996 e GANDARA, 1996, sendo que na floresta estacional semidecidual há o trabalho realizado por MORAIS (1992) com aroeira (*Myracrodruon urundeuva*).

Os índices utilizados para estimar a variabilidade genética em espécies de plantas têm sido a porcentagem de locos polimórficos (P), o número médio de alelos por loco (A), e a heterozigosidade ( $H_T$ ). HAMRICK e GODT (1990), por exemplo, em uma revisão que envolveu 449 espécies de plantas, obtiveram, para espécies tropicais, uma heterozigosidade de 0,278, uma média de 49,2% de locos polimórficos e 1,81 alelos por loco enquanto que HAMRICK e LOVELESS (1986), em um outro estudo envolvendo apenas espécies arbóreas tropicais, encontraram valores que variaram de 0,000 a 0,216 com uma média de 0,111 para  $H_T$ , 0 a 54,2% e média de 0,28% para P e 1,00 a 1,98 com média de 1,45 para A.

O estudo da variabilidade genética em populações naturais envolve ainda, segundo (HAMRICK, 1983), os seguintes aspectos:

**(i) Os níveis de variabilidade genética mantido dentro de espécies ou populações.**

Dentro de populações os níveis de variabilidade são estimados através da diversidade genética e dos índices de fixação (endogamia).

A diversidade genética é geralmente estimada através de P, A e da diversidade genética ou heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) segundo conceito proposto por NEI (1973).  $H_e$  se refere ao nível de heterozigosidade em uma população, obtido a partir das suas frequências alélicas. Este valor se refere à quantidade de heterozigotos esperada (heterozigosidade) em uma população de cruzamentos ao acaso (panmítica). WEIR (1990) destaca que, apesar da importância da estimativa da frequência de heterozigotos na população em estudo, já que os genótipos heterozigotos transportam dois alelos diferentes, a diversidade gênica (ou heterozigosidade média esperada) é um estimador mais apropriado na medida em que leva em conta a variabilidade resultante da existência de diferentes alelos em homozigose na população, tal como ocorre em espécies de autofecundação. Dados de diversidade genética dentro de populações naturais de espécies arbóreas tropicais encontram-se na Tabela 22 dos ANEXOS.

Dados da literatura têm mostrado que a variabilidade genética alozímica difere entre grupos taxonômicos e que a variabilidade dentro de populações está associada à história vital das espécies, principalmente à amplitude geográfica, sistema de cruzamento e tempo de vida fértil (HAMRICK, 1983; LOVELESS e HAMRICK, 1984; HAMRICK e GODT, 1990).

O modelo clássico do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ou Equilíbrio de Panmixia prediz que, em uma população de cruzamento aleatório (população panmítica), para um loco sobre o qual não atuam forças evolutivas como mutação, migração, seleção ou deriva genética, a frequência dos alelos permanecerá constante através das gerações. Mesmo ocorrendo rearranjo dos genótipos, uma única geração de cruzamento aleatório é capaz de restabelecer as frequências genotípicas binomiais, que, assim como as frequências alélicas, não se alterarão nas gerações subsequentes (para uma revisão veja WEIR, 1990). Através do cálculo do desvio das frequências genotípicas observadas em relação às frequências genotípicas esperadas sob o modelo do EHW, pode-se inferir se as pressuposições do modelo foram violadas. Em outras palavras, o desvio em relação ao EHW evidencia que forças evolutivas tais como seleção, deriva genética e migração estão atuando sobre estas populações ou que está havendo desvio da panmixia.

**(ii) O modo como a variabilidade genética se distribui entre e dentro de populações.**

As características que influenciam essa distribuição da variabilidade genética incluem o tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica das espécies, o modo de reprodução principal, o sistema de cruzamento, o mecanismo de dispersão de sementes e o tipo de comunidade em que a espécie geralmente ocorre (HAMRICK, 1983). Logo, em espécies com pequenas populações, reprodução vegetativa e limitada dispersão de pólen e semente, deve-se esperar uma pequena variabilidade dentro de populações e uma elevada variabilidade entre populações. Por outro lado, espécies com grande amplitude geográfica, elevada fertilidade, modo de reprodução cruzada, polinização pelo vento, um longo tempo de vida e habitats que representam os últimos estágios sucessionais tendem a ter maior variabilidade alozímica dentro das populações e pouca diferenciação entre populações do que espécies com outras combinações das características da história vital (HAMRICK et al., 1979).

No que concerne especificamente as espécies arbóreas tropicais, KAGEYAMA (1987) destaca que estas apresentam características demográficas e modos de reprodução completamente diversos dos da floresta temperada, e que influem de forma decisiva sobre a estrutura genética das populações naturais. Na floresta tropical, a maioria das espécies arbóreas ocorre em baixa densidade (KAGEYAMA, 1987). Por outro lado, as espécies tropicais exibem complexos padrões de florescimento e sistema reprodutivo (BAWA, 1974). A polinização se dá quase que exclusivamente por animais, desde minúsculas vespas até grandes morcegos (BAWA et al. 1985), sendo que a maioria das

espécies apresenta, ainda, fertilização cruzada devido à autoincompatibilidade ou dioiccia (BAWA, 1974; MURAWSKI e HAMRICK, 1991). Enquanto que as sementes de espécies da floresta temperada são dispersas pelo vento, na floresta tropical, parte dessa dispersão é feita por animais (KAGEYAMA, 1987).

Com base na hipótese de que é possível associar as características da história vital e a estrutura genética, analisar-se-á a estrutura genética de *A. polyneuron*. Conforme apresentado na revisão sobre *A. polyneuron*, trata-se, neste sentido, de uma espécie secundária do ponto de vista sucessional (segundo classificação de BUDOWSKI, 1965), hermafrodita e que tem suas sementes dispersas pelo vento (anemocoria). Tais características são compartilhadas por diversas espécies arbóreas da floresta tropical.

MORELLATO (1991) estimou, através da síndrome floral, que 12% das espécies do estrato superior da floresta estacional semidecidual por ela estudada (dossel e emergentes) apresentaram polinização por mariposas e esfingídeos, inclusive *A. polyneuron*. Se considerarmos que, do ponto de vista da distância do fluxo gênico, polinizadores como borboletas, vespas, moscas, mariposas e demais pequenos insetos devem ter aproximadamente a mesma capacidade de distância de vôo, essa taxa sobe para pelo menos 50% nesse estudo realizado por MORELLATO. CHASE et. al. (submetido), estudando uma espécie arbórea na Costa Rica, *Pithecellobium elegans*, uma espécie polinizada por mariposas, através do uso de marcadores genéticos microssatélites, encontraram distância de fluxo de pólen de até 350 m, evidenciando que esse tipo de polinizador pode ser efetivo a longas distâncias. Apesar de existirem muitas espécies de mariposas, podendo alcançar diferentes distâncias de vôo, esse é um indicativo de que há possibilidade de que o fluxo de pólen também seja efetivo a longa distância em *A. polyneuron*. Essas são informações especulativas, pois o seu porte emergente, atingindo grandes alturas, suas flores pequenas e sua floração irregular, apresentam dificuldades ao estudo da biologia floral desta espécie, de tal forma que nenhum trabalho sistemático ainda foi realizado até o momento.

A dispersão anemocórica é uma forma comum de dispersão de sementes em florestas estacionais semidecíduais. MORELLATO (1991) verificou que 27% das espécies de árvores e arbustos da Reserva de Santa Genebra (Campinas-SP) são anemocóricas, sendo que se forem consideradas somente as espécies do estrato superior (dossel e emergentes) essa taxa passa a ser de 39%. A autora citada observou que em 58% destas espécies a dispersão ocorre na estação seca, quando a deiscência dos frutos e dispersão das sementes seria facilitada pela menor umidade relativa do ar, baixa precipitação e

ventos mais fortes. Considerando-se o ponto de vista de MORELLATO (1991), o fato de *A. polyneuron* encontrar-se no estrato emergente favoreceria, portanto, a dispersão de sementes a longa distância.

Estas são características da biologia de *A. polyneuron* que suportam a hipótese de que esta espécie apresenta alta diversidade genética dentro das populações, com pouca diferenciação entre populações.

### **3.2.2 Fluxo gênico**

A movimentação de alelos entre populações tem sido caracterizada pelo fluxo gênico. SLATKIN (1985), em uma revisão sobre o assunto, discute as implicações evolutivas do fluxo gênico sobre a coesão ou disrupção entre populações naturais de plantas e a estimativa deste parâmetro através de métodos diretos e indiretos. Os métodos indiretos se baseiam na relação que existe entre a taxa de migração e a divergência entre populações. GOVINDARAJU (1988a, 1988b e 1989) obteve estimativas para o fluxo gênico através do uso do  $G_{ST}$  (conforme CROW e AOKI, 1984) para diversas espécies de plantas, encontrando uma estreita relação entre fluxo gênico e taxa de cruzamento e entre fluxo gênico e capacidade de dispersão de pólen, estimada através do tipo de polinização. Diversos trabalhos realizados com espécies arbóreas e arbustivas tropicais, utilizando marcadores alozímicos, têm evidenciado pequena diferenciação entre populações através dos estimadores  $G_{ST}$  e  $F_{ST}$  (Tabela 23 dos ANEXOS). Conforme pode ser verificado na Tabela 23 dos ANEXOS, os valores que têm sido obtidos para espécies arbóreas tropicais se situam acima de 1,0. Segundo SLATKIN (1987), quando  $Nm \leq 1$ , a deriva genética pode levar à diferenciação entre populações, enquanto que quando  $Nm > 1$ , o fluxo gênico é suficientemente amplo para contrapor os efeitos da deriva.

### **3.2.3 Implicações sobre Conservação e Manejo**

A estrutura genética de populações naturais de árvores tem implicações diretas sobre as estratégias a serem adotadas para o seu manejo e conservação (EGUIARTE et al. 1992). Segundo (EGUIARTE e PIÑERO, 1990), em espécies arbóreas tropicais que ocorrem em populações pequenas

endogâmicas, poucos indivíduos coletados de muitas populações diferentes são capazes de manter a diversidade genética da espécie, sendo a conservação *ex situ* uma estratégia viável. Por outro lado, quando o tamanho populacional efetivo é grande, com endogamia reduzida, a diminuição da população gerará um considerável aumento da endogamia, que pode levar à depressão endogâmica devido à exposição de alelos deletérios recessivos que eram mantidos em heterozigose nas populações (FRANKLIN, 1980) e devido à diminuição da viabilidade e redução da fecundidade (LANDE, 1988). Neste último caso, a conservação *ex situ* tem alcance limitado, sendo a conservação *in situ* fundamental para garantir a conservação da diversidade genética. Este é o caso de espécies preferencialmente alógamas e que, portanto, tendem a ser altamente susceptíveis à depressão endogâmica (FUTUYMA, 1993).

Caso a hipótese de HAMRICK et al. (1979) de que existe uma relação entre as características da história vital das espécies e sua estrutura genética seja verdadeira, estratégias de manejo e conservação poderiam se basear nas características da história vital. Desta forma, seria possível o estabelecimento de estratégias adequadas para a conservação *in situ*, coleta de germoplasma para conservação *ex situ* e obtenção de indicativos de potencial de manejo, a partir do conhecimento das características da biologia, aliado a informações referentes à estrutura demográfica das espécies.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Levantamento de Campo e Enxertia

Em cada uma das duas populações de *A. polyneuron* descritas no Capítulo I (item 5), foram coletados ramos (para enxertia) e folhas (para realização das análises alozímicas) de todos os indivíduos amostrados. As árvores da População 1 tiveram seus ramos coletados em junho de 1995, os quais foram levados ao Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, em Piracicaba-SP, onde foi feita a enxertia sobre mudas de *A. polyneuron*. Foram executadas 4 enxertias para cada indivíduo coletado e os enxertos, assim obtidos, foram mantidos em viveiro coberto com sombrite 50%. O mesmo procedimento foi executado para a População 2 em novembro de 1995. A realização destas enxertias teve como objetivo investigar a viabilidade do uso deste método para a obtenção de folhas para as análises alozímicas próximo ao laboratório, assim como para obtenção de mudas com os genótipos das populações estudadas para plantio de conservação *ex situ* e formação de pomares para produção de sementes a partir deste germoplasma de diversidade genética conhecida. Este método foi usado com sucesso por GANDARA (1993) no estudo alozímico de *Cedrela fissilis*. Este autor descreve detalhadamente a metodologia de coleta e enxertia.

Foram realizados testes para verificar se as enzimas produzidas pelos porta-enxertos alteram, de alguma forma, o metabolismo das plantas, com alterações na estrutura das enzimas produzidas pela estaca enxertada. Comparou-se, para este fim, folhas coletadas diretamente de 5 indivíduos adultos amostrados na Estação Ecológica dos Caetetus com as folhas obtidas via enxertia correspondentes a estes mesmos indivíduos. Todos os sistemas enzimáticos utilizados para estimar as frequências alélicas no presente trabalho foram testados.

Devido à baixa taxa de pegamento das enxertias, todas as análises alozímicas foram executadas utilizando-se amostras de folhas coletadas dos indivíduos adultos.

## 4.2 Transporte e Armazenamento de Folhas

As folhas de *A. polyneuron* são semicoriáceas, mantendo-se túrgidas por um longo período após a coleta, não havendo necessidade, portanto, de se proceder à extração das alozimas logo após a coleta. As folhas coletadas a partir dos indivíduos das duas populações analisadas eram embaladas em sacos plásticos e mantidas em baixa temperatura, através do uso de gelo em caixa de isopor, até a chegada ao laboratório, em Piracicaba, onde eram mantidas em geladeira (5°C a 10°C) até a realização das análises.

Folhas coletadas e armazenadas da forma acima descrita mantêm íntegras as suas enzimas por um tempo de até 20 dias após a coleta. Se for necessária a conservação deste material por um tempo superior a 20 dias, é necessário que seja feita a extração e embebição do extrato obtido em pedaços de papel de filtro (papel whatman nº3) com 6 x 10 mm que, armazenados em eppendorfs, devem ser mantidos em N líquido (-180°C). O descongelamento só pode ser feito uma única vez e os pedaços de papel de filtro embebidos com extrato devem ser imediatamente colocados no gel para início da “corrida” eletroforética. O armazenamento de extrato em pedaços de papel de filtro em freezer (-18°C), método comumente utilizado para outras espécies arbóreas tropicais, não foi efetivo na conservação da integridade das enzimas de *A. polyneuron* no presente estudo.

## 4.3 Densidade e Distribuição Espacial

A densidade dos indivíduos nas populações estudadas foi obtida dividindo-se o número de indivíduos acima de 8 cm de DAP encontrados em cada população pela sua área (ha) respectiva.

O método utilizado para avaliar a distribuição espacial dos indivíduos das duas populações estudadas foi o do **Vizinho Mais Próximo** descrito por CLARK e EVANS (1954). Este método tem por objetivo verificar o desvio da distribuição espacial da população estudada com relação à uma distribuição aleatória. Segundo CLARK e EVANS (1954), a distribuição aleatória é aquela em que qualquer ponto (indivíduo) tem a mesma chance de ocorrer em qualquer sub-área da área estudada, assim como qualquer sub-área tem a mesma chance de receber qualquer ponto e, ainda, a posição de cada ponto não tem influência de nenhum outro ponto.

Segundo o modelo descrito por CLARK e EVANS (1954), quando a razão entre a distância média observada entre os vizinhos mais próximos e a distância esperada para esta distância (R) for igual a 0 há máxima agregação; quando este valor for igual a 1 a distribuição é aleatória; e quando for igual a 2,1491, há perfeita uniformidade na distribuição dos indivíduos.

A metodologia para o cálculo de R encontra-se detalhada em CLARK e EVANS (1954), onde:

$$R = \text{índice de agregação} \Rightarrow R = \frac{\bar{r}_A}{\bar{r}_E}$$

$$\bar{r}_A = \text{distância média ao vizinho mais próximo} \Rightarrow \bar{r}_A = \frac{\sum r}{N}$$

$\bar{r}_E$  = distância esperada ao vizinho mais próximo, caso a distribuição fosse aleatória

$$\Rightarrow \bar{r}_E = \frac{1}{2\sqrt{\rho}}$$

onde:

N = número de medidas de distância realizadas na amostra

r = distância de um indivíduo a seu vizinho mais próximo

$\rho$  = densidade (número de indivíduos/área)

A significância estatística de R é calculada através do desvio padrão da curva normal de distribuição (c). Os valores de 1,96 e 2,58 para c representam, respectivamente, os níveis de 5% e 1% de significância.

$$c = \frac{\bar{r}_A - \bar{r}_E}{\sigma_{\bar{r}_E}}$$

$$\text{onde } \sigma_{\bar{r}_E} = \frac{0,26136}{\sqrt{N\rho}}$$

#### **4.4 Distribuição de Tamanho**

A distribuição de tamanho foi avaliada, para os indivíduos adultos, através da construção de uma curva de distribuição diamétrica para cada população estudada. Foram utilizados todos os indivíduos com DAP acima de 8 cm amostrados.

Para a amostragem de indivíduos jovens (de 750 m<sup>2</sup>) foi construída uma curva de distribuição de altura.

#### **4.5 Análises Eletroforéticas**

A metodologia utilizada foi a eletroforese de alozimas em gel horizontal de amido de milho (penetrose) a 13%, descrita por KEPHART (1990) e ALFENAS et al. (1991).

As diversas etapas do processo de eletroforese de alozimas são descritas a seguir, sendo que pequenas alterações com relação aos autores citados acima foram feitas, de forma a adequar o método para a espécie em estudo.

##### **4.5.1 Extração**

Foi testada, visando determinar o tecido com maior atividade enzimática, a extração de enzimas a partir de gemas, folhas jovens e folhas maduras saudáveis. Os zimogramas com melhor definição de bandas foram obtidos a partir de folhas maduras (verde escuro) saudáveis (sem traços de degeneração ou contaminação por patógenos). Este foi, portanto, o tecido utilizado nas análises dos indivíduos adultos, enquanto que para os indivíduos jovens foram utilizadas as folhas disponíveis mais maduras e saudáveis possível.

Foram testados diversos tipos de tampão de extração encontrados na literatura corrente (ALFENAS, 1991; KEPHART, 1990; SOLTIS et al., 1983). Entretanto, a metodologia que se mostrou mais eficiente para a extração de enzimas de *A. polyneuron* foi a descrita a seguir:

A extração das enzimas era feita através da maceração de aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, adicionando-se cerca de 10 mg de areia lavada (48 horas em água corrente, 24 horas em ácido nítrico concentrado, seguido de 48 horas em água corrente) e 200 µl de solução de extração modificada (Tabela 2) a partir da solução de extração número 1 de ALFENAS et al. (1991).

A extração era feita macerando-se o tecido com um bastão de vidro em placas de porcelana resfriadas. Todo o processo era executado sobre barras de gelo mantendo-se, assim, a integridade das enzimas.

*Tabela 2: Solução de extração utilizada nas análises alozímicas de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa). Receita modificada a partir da solução de extração número 1 de ALFENAS et al. (1991). Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

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 - BORAX (2,5 mM)	50 mg
polietilenoglicol-6000 (1 %)	1 g
água destilada (q.s.p.)	100 ml

Imediatamente após a extração das enzimas, a solução obtida era absorvida em pedaços de papel de filtro (papel whatman nº3) com 6 x 10 mm, que eram aplicados lado a lado no gel. Eram colocadas 20 amostras em cada gel, além de dois pedaços de papel de filtro contendo solução marcadora de azul de bromofenol a 0,1% nas extremidades, para a marcação da linha de frente durante a migração.

#### **4.5.2 Tampões de Eletrodo e Gel e Sistemas Enzimáticos**

Foram realizados testes preliminares testando combinações de três sistemas de tampão gel/eletrodo: tris-citrato (SOLTIS et al., 1983), citrato morfolina (CLAYTON e TRETIAK, 1972) e histidina (STUBER et al., 1988), com os 24 sistemas enzimáticos listados a seguir:

álcool desidrogenase (ADH - EC 1.1.1.1), aldolase (ALD - EC 4.1.2.13), catalase (CAT - EC 1.11.1.6), diaforase (DIA - EC 1.8.1.4), enzima málica (ME - EC 1.1.1.40), endopeptidase (ENP - EC 3.4.-.-), 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), fosfoglucoose 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 (PER - 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)

A partir destes testes, foram escolhidos 7 sistemas enzimáticos pela sua boa resolução e constância. Somente os tampões citrato morfolina (CM) e tris-citrato (TC) apresentaram resultados satisfatórios. Na Tabela 3, a seguir, estão especificados os sistemas de tampão gel/eletrodo utilizados para cada sistema enzimático.

Os protocolos que foram utilizados neste trabalho para a revelação das alozimas encontram-se nos ANEXOS (item 1).

*Tabela 3: Sistemas enzimáticos e respectivos sistemas de tampão gel/eletrodo, amperagem e voltagem utilizados nas análises alozimicas de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa). Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

<b>Enzima</b>	<b>Sistema tampão gel/eletrodo</b>	<b>Concentração</b>	<b>Amperagem</b>	<b>Voltagem</b>
6PGDH LAP MDH PGI PGM PER	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)	$i_{inicial} = 25 \text{ A}$ $i_{após 45'} = 35 \text{ A}$	$V_{inicial} = 250 \text{ V}$ $V_{após 45'} = 300 \text{ V}$
SKDH	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)	$i_{inicial} = 30 \text{ A}$ $i_{após 45'} = 35 \text{ A}$	$V_{inicial} = 150 \text{ V}$ $V_{após 45'} = 200 \text{ V}$

#### **4.5.3 Condições da Corrida**

Durante a migração, os géis eram mantidos à temperatura de aproximadamente 5°C (em geladeira, colocando-se uma placa de gelo sobre o gel). Após 45 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 7,5 a 8,5 cm de migração.

Após a migração, os géis eram cortados em fatias de aproximadamente 1,5 mm de espessura cada uma e preparados para coloração específica para revelação de cada sistema enzimático.

#### **4.5.4 Leitura e Interpretação dos Zimogramas**

A leitura dos zimogramas obtidos era feita logo após a revelação das alozimas. As bandas eram desenhadas em filme plástico com canetas de retroprojeter, mantendo-se as dimensões originais. Todos os géis eram fotografados para permitir reproduções fiéis dos zimogramas, possibilitando a conferência posterior de dúvidas eventuais na interpretação.

A denominação dada aos locos e alelos foi feita da seguinte maneira: quando mais de uma zona de atividade enzimática 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 de maior migração recebeu a denominação de 1 e os demais foram numerados conforme a distância de migração seguinte.

Era colocada uma amostra de um indivíduo de genótipo conhecido em cada gel (testemunha) para não haver dúvidas sobre a identificação dos alelos.

## 4.6 Metodologia Estatística

### 4.6.1 Variabilidade Genética

A variabilidade genética foi caracterizada a partir das estimativas das frequências alélicas e dos seguintes índices de diversidade: número médio de alelos por loco ( $A$ ) e por loco polimórfico ( $A_p$ ), porcentagem de locos polimórficos ( $P$ ), heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ). Estes dois últimos também foram estimados considerando-se somente os locos polimórficos ( $H_{ep}$  e  $H_{op}$ ).

As frequências alélicas foram estabelecidas a partir da leitura dos zimogramas e definição dos genótipos de cada indivíduo, da seguinte forma:  $\hat{p}_{ij} = n_{ij}/n_j$ , onde  $\hat{p}_{ij}$  = frequência do alelo  $i$  na população  $j$ ,  $n_{ij}$  = número de ocorrências do alelo  $i$  na população  $j$  e  $n_j$  = número total de alelos amostrados na população  $j$ .

Para a estimativa da porcentagem de locos polimórficos foram utilizados dois critérios, considerando polimórficos os locos que apresentavam frequência do alelo mais comum inferior a 99% e 95%, respectivamente. A porcentagem de locos polimórficos foi calculada dividindo-se o número de locos polimórficos pelo número total de locos amostrados.

O número médio de alelos por loco foi obtido somando-se todos os alelos observados e dividindo esse número pelo número total de locos amostrados.

A estimativa da heterozigosidade média observada ( $\hat{H}_o$ ), calculada para cada loco individualmente, foi obtida diretamente da amostra a partir das frequências genotípicas observadas

(Tabelas 25 e 26 dos ANEXOS), enquanto que a heterozigidade média observada foi obtida através da média aritmética de todos os locos analisados.

A heterozigidade esperada foi estimada para cada loco, conforme NEI (1978):

$\hat{H}_e = 2n(1 - \sum \hat{p}_i^2) / (2n - 1)$ , onde n = número de indivíduos amostrados. A heterozigidade esperada média foi calculada através da média aritmética de todos os locos analisados.

As estimativas de A, Ap, P, H<sub>e</sub>, H<sub>o</sub>, H<sub>ep</sub> e H<sub>op</sub>, foram geradas pelo programa BIOSYS (SWOFFORD e SELANDER, 1989).

#### ***4.6.2 Verificação do Ajuste ao Modelo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)***

A partir das frequências alélicas, foram estimadas as frequências genotípicas esperadas para os homozigotos e heterozigotos, respectivamente, sob acasalamento aleatório (modelo do EHW-Tabela 27 dos ANEXOS). A verificação dos desvios da panmixia foi feita através de um teste de qui-quadrado entre os números observados de homozigotos e heterozigotos e aqueles esperados segundo as expectativas do EHW, para cada loco polimórfico, em cada população estudada.

O programa BIOSYS, utilizado na geração destas estimativas, também calcula a significância do teste de desvio do EHW através do teste exato de Fisher que, segundo WEIR (1990), é mais adequado e seguro quando os números esperados nas células têm valores pequenos.

A adequação ao modelo do EHW foi também verificada através da abordagem via coeficiente de endogamia ou índice de fixação (F de Wright) dentro da cada população (WEIR, 1990). O F de Wright corresponde à fração de redução na heterozigidade com relação ao esperado em uma população de acasalamento aleatório (em EHW):  $F = (H_o - H_e) / H_e$ . Assim, segundo WEIR (1990), valores de F iguais a zero indicam que a população está em EHW, valores significativamente menores do que zero indicam um excesso de heterozigotos, enquanto que valores significativamente maiores do que zero indicam um excesso de homozigotos.

O teste usado para verificar a significância de F foi o  $\chi^2$  sugerido por LI e HORVITZ (1953):

$$\chi^2 = nF^2 (k-1)$$

onde  $k$  = número de alelos e  $n$  = tamanho amostral

com  $\{k(k-1)\}/2$  graus de liberdade.

O teste para verificação da significância do índice médio de fixação foi feito utilizando-se o tamanho médio amostral, sendo os graus de liberdade calculados através do número médio de alelos por loco. Quando o número de graus de liberdade foi fracionado, foi utilizado o número inteiro menor mais próximo para a consulta da tabela de qui-quadrado, conforme sugerido por LEPSCH-CUNHA (1996).

#### ***4.6.3 Verificação do Ajuste ao Modelo do Equilíbrio de Endogamia de Wright***

Segundo BROWN e WEIR (1983), um dos fatores que podem levar à não adequação das frequências genotípicas ao EHW é o sistema de cruzamento, o que pode ser testado através de um modelo alternativo (o modelo de cruzamento misto), que considera no sistema de reprodução, acasalamentos aleatórios e autofecundação. Este modelo é o do Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW), que inclui o índice de fixação ( $F$  de Wright) nos cálculos das frequências genotípicas esperadas (Tabela 27 dos ANEXOS).

Este modelo foi testado para os locos em que não houve adequação ao modelo do EHW e que possuíam mais de dois alelos, devido à computação dos graus de liberdade.

#### ***4.6.4 Caracterização da Distribuição da Variabilidade Entre e Dentro das Populações***

A caracterização da estrutura genética das duas populações estudadas foi feita através das estatísticas de Wright (WRIGHT, 1951, 1965) e da análise da diversidade genética em populações subdivididas de Nei (NEI, 1973, 1977, 1987). Estas abordagens são complementares, conforme discutido por REIS (1996), ou seja, as estatísticas  $F$  permitem, além de caracterizar como está distribuída a variabilidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ), produzir informações sobre os níveis médios de fixação a nível de população ( $F_{IS}$ ) e a nível de espécie ( $F_{IT}$ ). Por outro lado, a diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973) permite a comparação dos níveis de heterozigosidade entre e dentro de populações e a obtenção de uma estimativa de divergência a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas de  $F_{ST}$ .

Da mesma forma que para a diversidade genética, as estatísticas F ( $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ ) de Wright (WRIGHT, 1951, 1965) também foram estimadas empregando-se o programa BIOSYS (SWOFFORD e SELANDER, 1989), conforme NEI (1977). REIS (1996) revisa e discute detalhadamente tais estatísticas, assim como as de NEI (1973, 1975) que envolvem os estimadores de  $H_T$  (heterozigosidade total),  $H_S$  (heterozigosidade dentro de populações) e  $G_{ST}$  (relação entre heterozigosidade total e a heterozigosidade entre populações, dada por  $D_{ST}$ ).

Assim, para cada loco, segundo NEI (1975),  $H_T$  pode ser estimado por:

$\hat{H}_T = 1 - \sum \bar{x}_i^2$ , onde  $\bar{x}_i$  corresponde à média ponderada da frequência do alelo  $i$  nas subpopulações.  $H_S$ , por sua vez, é obtido pela média ponderada dos valores de  $1 - \sum x_i^2$  de cada população.

A porção da heterozigosidade que se encontra entre as populações é estimada por:

$$\hat{G}_{ST} = \hat{D}_{ST} / \hat{H}_T, \text{ sendo } \hat{D}_{ST} = \hat{H}_T - \hat{H}_S.$$

As estimativas de  $H_T$ ,  $H_S$  e  $G_{ST}$  para todos os locos foram obtidas através da média dos resultados obtidos para cada loco analisado.

Conforme demonstrado por NEI (1987), por definição  $G_{ST}$  equivale a  $F_{ST}$ , entretanto COCKERHAM e WEIR (1993) não consideram  $G_{ST}$  como estimador de  $F_{ST}$ , argumentando que o processo amostral associado à obtenção das informações pode gerar vieses nas estimativas.

#### ***4.6.5 Estimativa do Fluxo Gênico***

A estimativa do fluxo gênico entre as Populações 1 e 2 foi obtida a partir da relação entre a quantidade de migrantes e a divergência entre populações obtida a partir do  $G_{ST}$ , de acordo com CROW e AOKI (1984):  $G_{ST} = [4 \alpha Nm + 1]^{-1}$ , onde  $\alpha = (n / n - 1)^2$ , e  $n$  = número de populações.

#### ***4.6.6 Taxa de Cruzamento Aparente***

A nível ilustrativo, foi calculada, para cada loco em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ou Equilíbrio de Endogamia de Wright, a taxa de cruzamento aparente  $t_a = (1-f)/(1+f)$  de (WRIGHT, 1921), sendo  $f$  a estimativa do índice de fixação existente ao nível de indivíduo. Um  $t$  médio foi então estimado para estes locos.

## 5. RESULTADOS

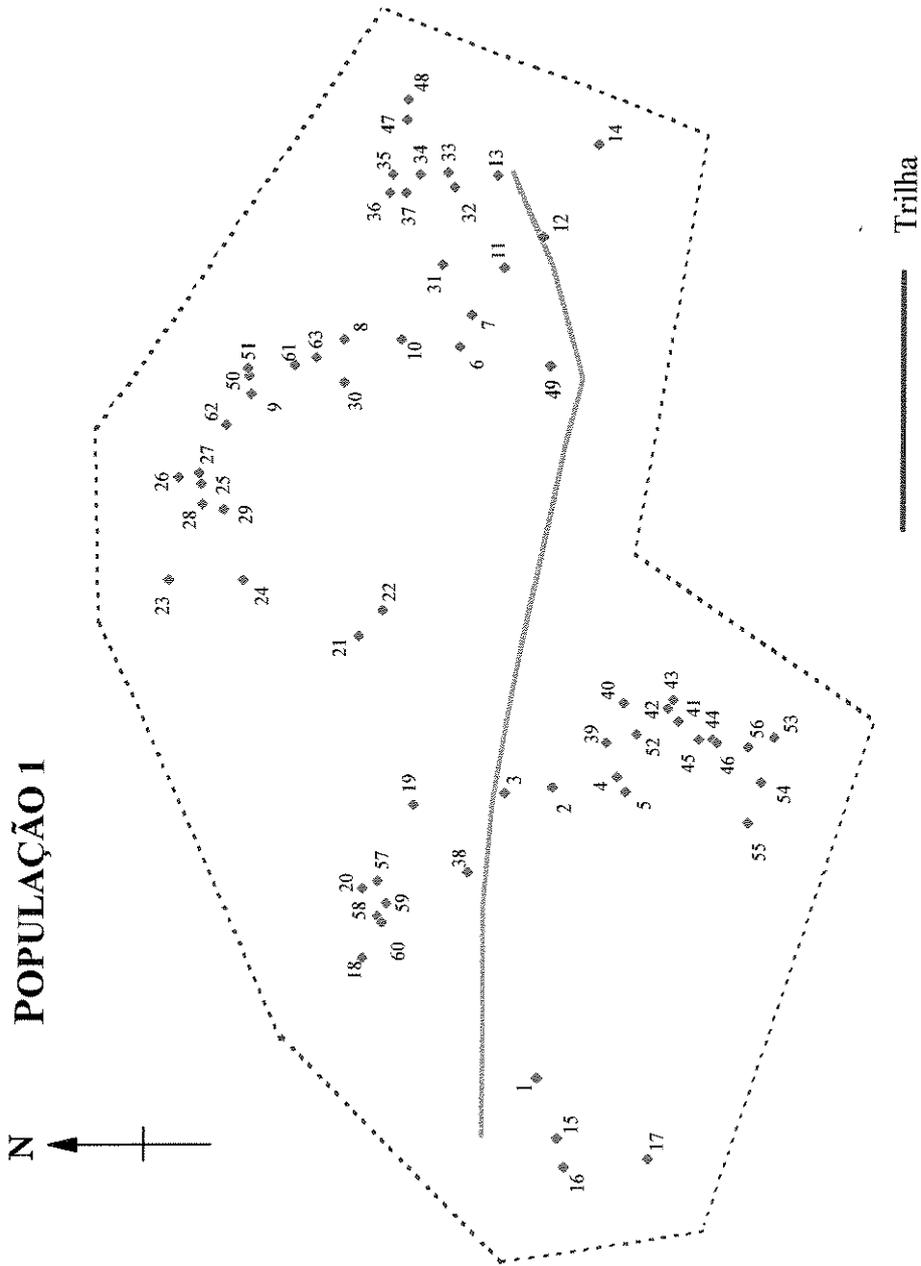
### 5.1 Levantamento das Populações

As parcelas nas quais foram amostradas as Populações estudadas abrangeram uma área aproximada de 8 ha cada. Na População 1 (Figura 4), foram amostradas 63 árvores com DAP acima de 8 cm. Na época da coleta, junho de 1995, não foi encontrado nenhum indivíduo com frutos (sendo que, de acordo com os dados de fenologia disponíveis, nesta época deveriam haver frutos novos, que estariam maduros e prontos para coleta em agosto). Em novembro, época em que foi coletada a população 2, 2 indivíduos da População 1 encontravam-se em início de floração, entretanto, em janeiro esses indivíduos não apresentavam nem flores nem frutos.

Usando o mesmo método, foram marcadas 53 árvores com DAP acima de 8 cm na parcela da População 2 (Figura 5). Nesta amostra, coletada em novembro de 1995, 3 indivíduos estavam em início de floração. Ainda, quando do retorno à esta população no final de janeiro de 1996, da mesma forma que para a população 1, não havia flores ou frutos nestes indivíduos, sendo que 3 outros indivíduos apresentavam frutos no início de seu desenvolvimento.

### 5.2 Enxertia das Estacas

Para a População 1, houve um pegamento das enxertias de 14%. Entretanto, como foram realizadas 4 repetições para cada indivíduo marcado no campo, 46,8% desses indivíduos tiveram pelo menos 1 muda obtida via enxertia. Para a População 2, entretanto, a taxa de pegamento foi muito inferior, correspondente a 3,3%, com apenas 9,4% dos indivíduos marcados no campo com pelo menos 1 muda produzida. GANDARA (1993) e GIMENEZ (1973, citado por GANDARA, 1993) obtiveram melhores resultados para outras espécies florestais, respectivamente 46% para *Cedrela fissilis* e 59% para *Cedrela odorata*.



**Figura 4:** Distribuição dos indivíduos da População 1 de peroba rosa (*A. polyneuron*) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

## POPULAÇÃO 2

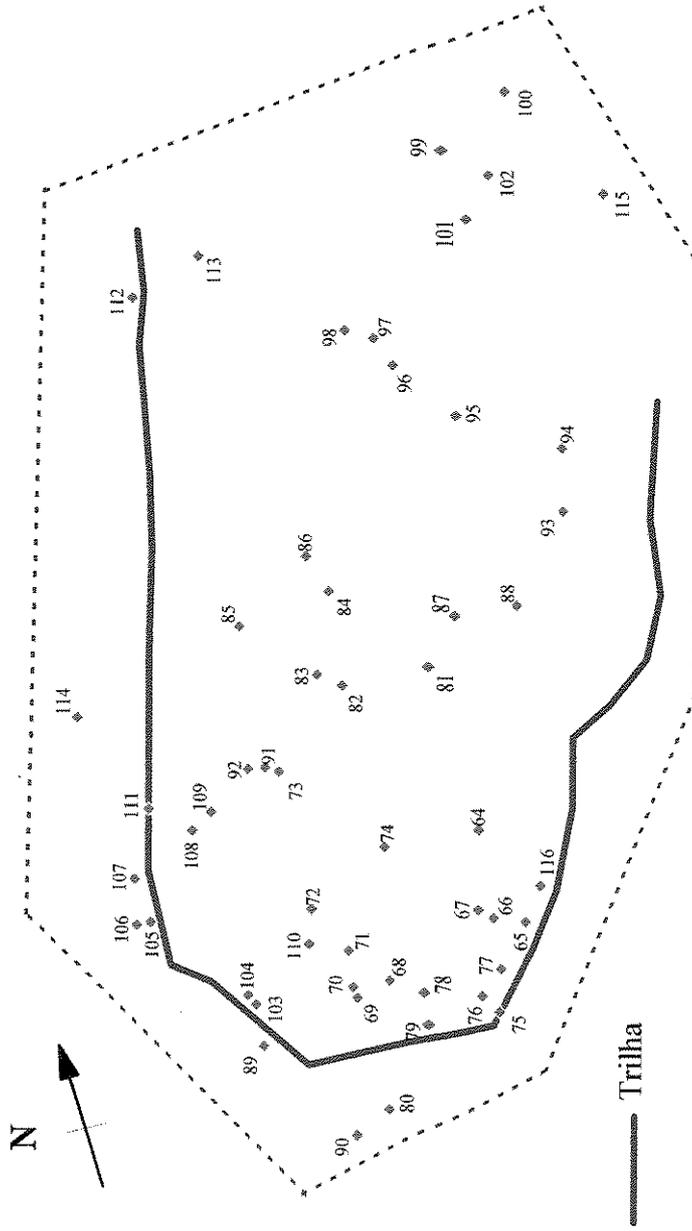


Figura 5: Distribuição dos indivíduos da População 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, Campinas-SP, UNICAMP, 1997.

O teste visando avaliar o efeito da enxertia sobre a produção de alozimas nas folhas novas produzidas pelo ramo enxertado foi feito através da comparação entre os zimogramas obtidos utilizando-se folhas de mudas enxertadas com os obtidos a partir de folhas coletadas de indivíduos no campo. Estes zimogramas foram idênticos para os 5 indivíduos testados, para todos os sistemas enzimáticos utilizados neste estudo, da mesma forma como foi observado por GANDARA (1993) em *Cedrela fissilis*.

### 5.3 Densidade e Distribuição Espacial

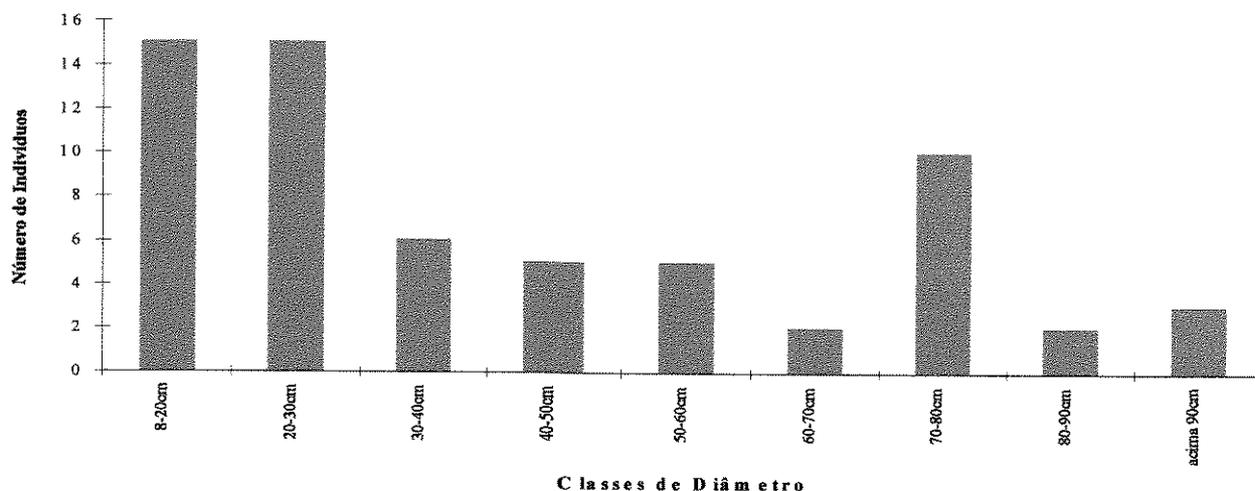
Ambas as parcelas das populações estudadas abrangeram uma área aproximada de 8 ha cada. A densidade (indivíduos/área) encontrada para as Populações 1 e 2 foi, portanto, de aproximadamente 7,9 indivíduos/ha e 6,6 indivíduos/ha, respectivamente. A localização espacial das árvores pode ser observada nas Figuras 4 e 5.

O padrão de distribuição espacial dos indivíduos de *A. polyneuron* foi considerado agregado para a População 1 e aleatório para a População 2, utilizando-se o método do vizinho mais próximo de CLARK e EVANS (1954). Os respectivos valores de R encontrados foram de 0,65 ( $c = 5,34^{**}$ ) para a População 1 e 0,88 ( $c = 1,62^{ns}$ ) para a População 2. Observando-se a Figura 4, nota-se que a análise visual coincide com o resultado obtido para a População 1. Na População 2, por sua vez, a análise visual sugere um leve agrupamento de indivíduos não detectado pelo método de CLARK e EVANS (1954), entretanto, o grau de aleatoriedade é claramente maior do que na População 1.

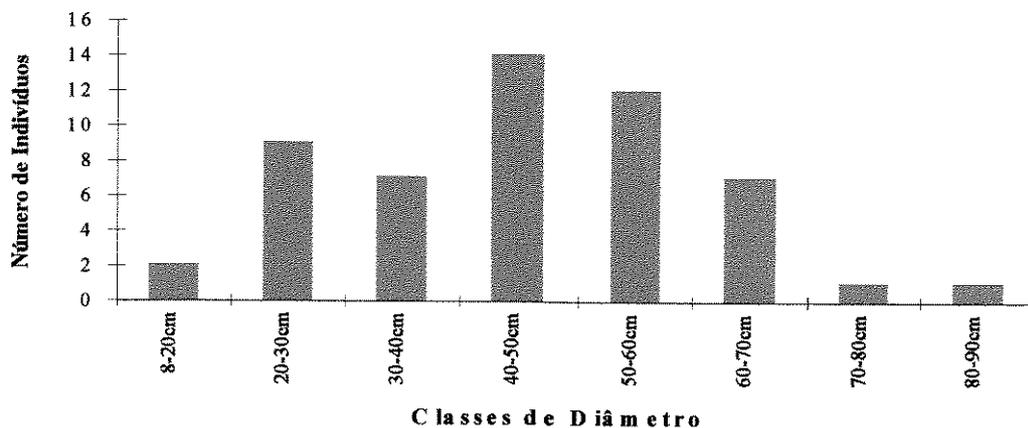
### 5.4 Distribuição de Tamanho

A partir dos diâmetros de todos os indivíduos mapeados obteve-se as Figuras 6 e 7, a seguir, com as curvas de distribuição diamétrica das Populações 1 e 2.

**Figura 6:** Distribuição diamétrica dos indivíduos amostrados na População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus - Gália-SP. Campinas-SP. UNICAMP. 1997.



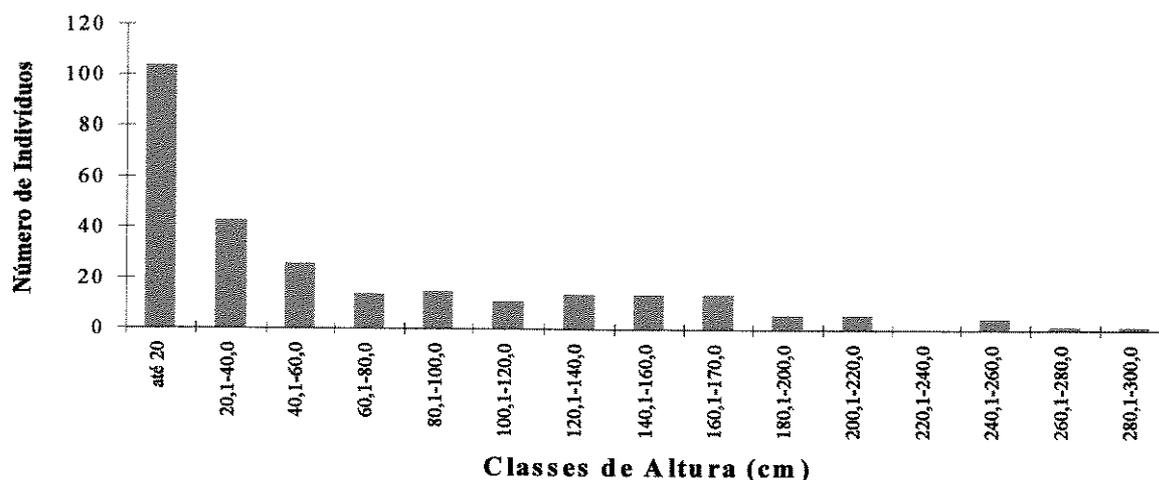
**Figura 7:** Distribuição diamétrica dos indivíduos amostrados na População 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus - Gália-SP. Campinas-SP. UNICAMP. 1997.



As curvas apresentaram diferentes padrões para as duas populações estudadas. Na População 1 foi detectado um padrão muito próximo do esperado para espécies em equilíbrio de acordo com MARTINS (1991), apesar de que o menor diâmetro considerado (8,0 cm) é muito grande para se avaliar regeneração. Na População 2, por outro lado, houve um menor número de indivíduos nas classes de menor diâmetro do que o esperado por este modelo, principalmente na classe entre 8 e 20 cm de DAP. Nas demais classes de diâmetro, houve, por um lado, um padrão comum em que um maior

número de indivíduos foi encontrado nas classes intermediárias, enquanto que houve um menor número de indivíduos nas classes de maior diâmetro (acima de 80 cm de DAP), conforme padrão esperado para espécies arbóreas longevas. Entretanto, as classes de diâmetro que apresentaram maior número de indivíduos diferiu bastante entre as duas populações, respectivamente entre 10 e 30 cm e entre 70 e 80 cm na População 1 e entre 40 e 60 cm na População 2.

**Figura 8:** Distribuição de altura de *Aspidosperma polyneuron* na amostra de indivíduos jovens da População 1 coletada na Estação Ecológica dos Caetetus - Gália-SP, Campinas-SP. UNICAMP. 1997

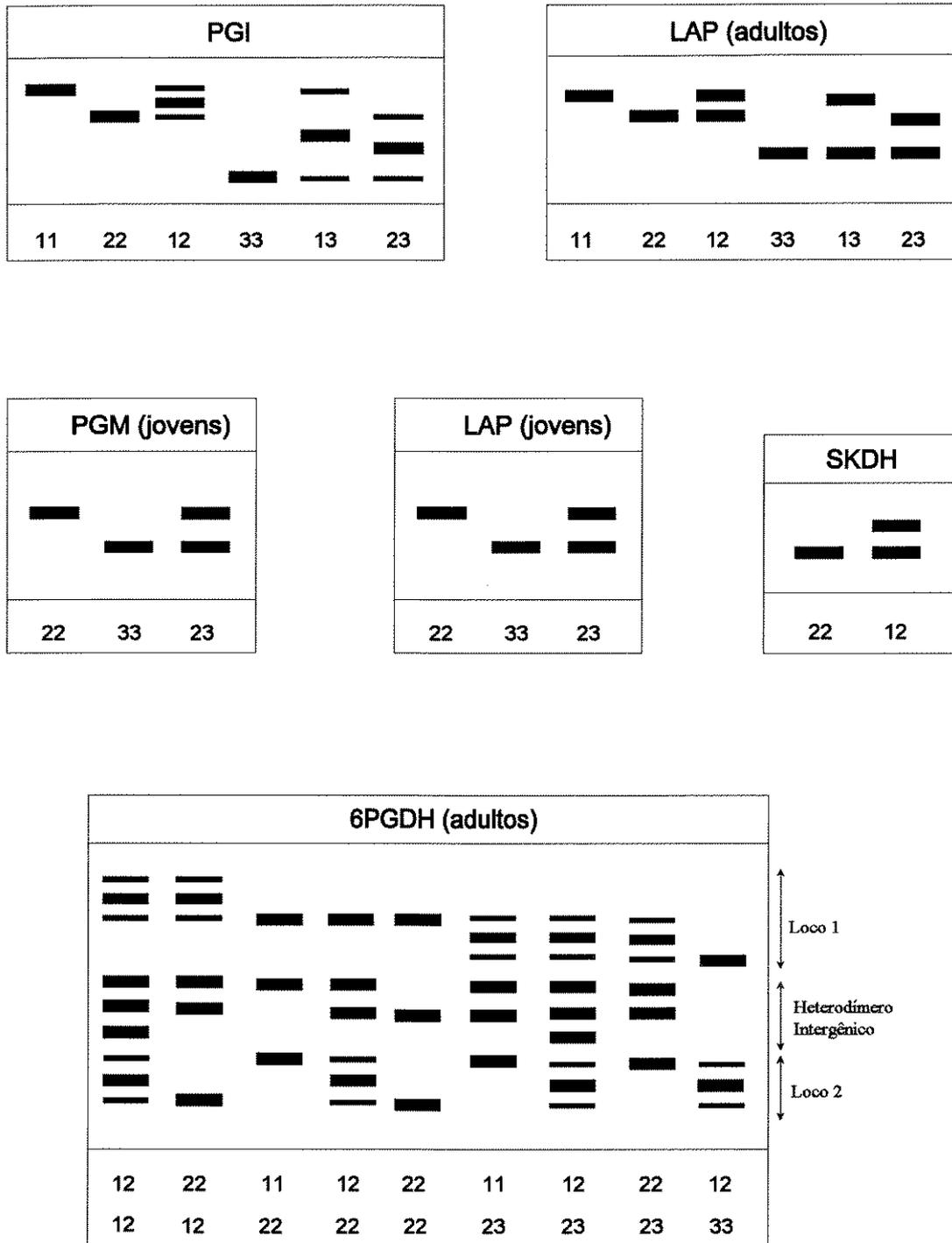


Para a amostra de indivíduos jovens, a curva de distribuição de altura apresentou o padrão esperado em J invertido, com maior abundância de plântulas (primeira classe) em relação às demais classes de diâmetro.

### 5.5 Interpretação Genética dos Zimogramas

A interpretação genética dos zimogramas obtidos para os sete sistemas enzimáticos utilizados no presente trabalho são apresentadas esquematicamente na Figura 9. Estas são condizentes com os padrões encontrados no estudo de outras espécies, principalmente no que se refere à estrutura das enzimas, número de locos por sistema enzimático e número de alelos por loco.

*Figura 9: Interpretação genética dos zimogramas dos sistemas enzimáticos polimórficos utilizados no estudo de duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus (Gália-SP). Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*



### ***6-Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH)***

Este sistema apresentou 3 zonas de atividade. A região mais catódica foi interpretada como um loco polimórfico de estrutura dimérica (enzima formada por duas subunidades), apresentando 3 alelos, sendo um deles raro (ocorreu em apenas 5 indivíduos). A região de migração mais lenta foi interpretada como um loco polimórfico, dimérico, dialélico. Entre essas duas zonas de atividade, há uma região formada por um heterodímero inter-gênico entre os locos 6Pgdh-1 e 6Pgdh-2.

### ***Fosfoglucoase isomerase (PGI)***

Esta enzima apresentou apenas uma zona clara de atividade, interpretada como um loco polimórfico, dimérico e dialélico.

Uma segunda zona, de migração mais rápida que a anterior, apareceu em alguns géis, porém sem resolução passível de interpretação.

### ***Leucina aminopeptidase (LAP)***

A leucina aminopeptidase apresentou somente uma zona de atividade, interpretada como um loco polimórfico, com três alelos e estrutura monomérica.

### ***Malato desidrogenase (MDH)***

Este sistema apresentou 3 zonas distintas, sendo que as regiões de migração mais rápida e mais lenta, respectivamente, apresentaram-se como locos monomórficos. A região de migração intermediária foi composta por uma única banda para todos os indivíduos analisados, portanto, pode se tratar tanto de um loco monomórfico quanto de um heterodímero inter-gênico entre os dois outros locos. Tal região não foi considerada nas análises, sendo este sistema interpretado como composto de dois locos monomórficos.

### ***Peroxidase (PER)***

Apenas uma região apareceu com constância e nitidez, sendo monomórfica.

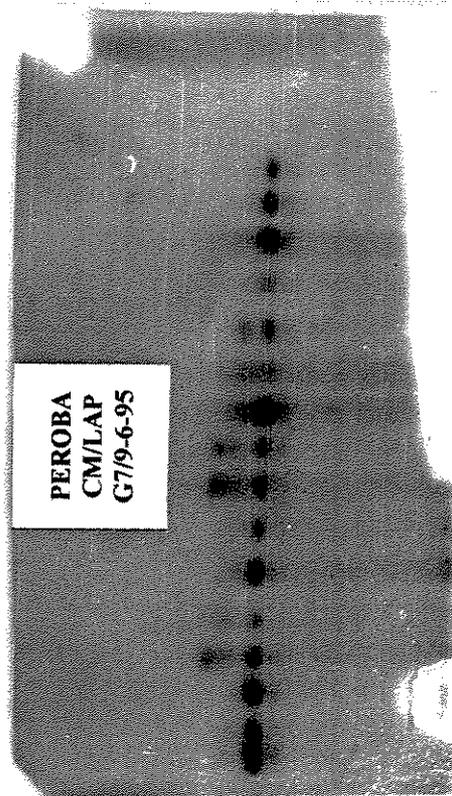
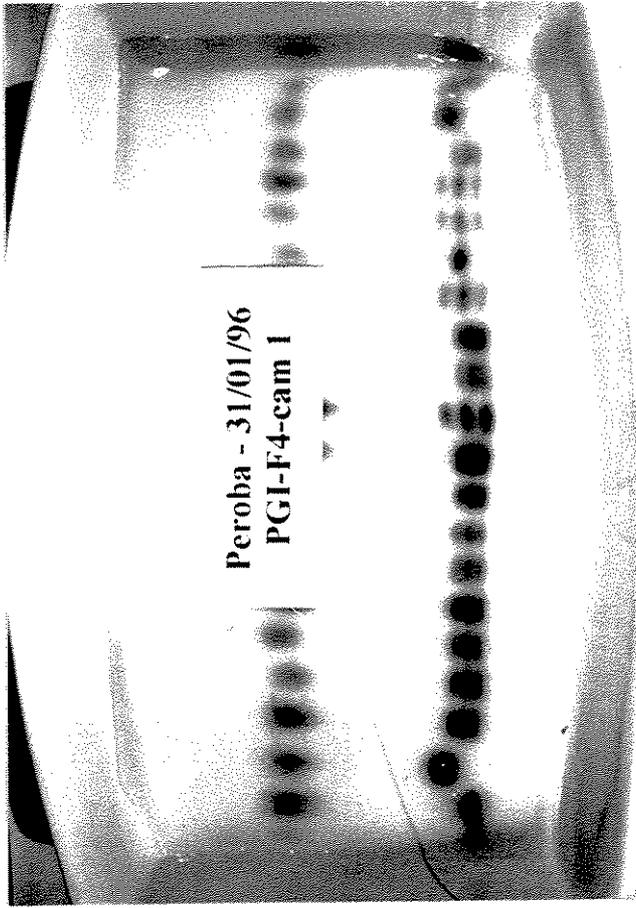
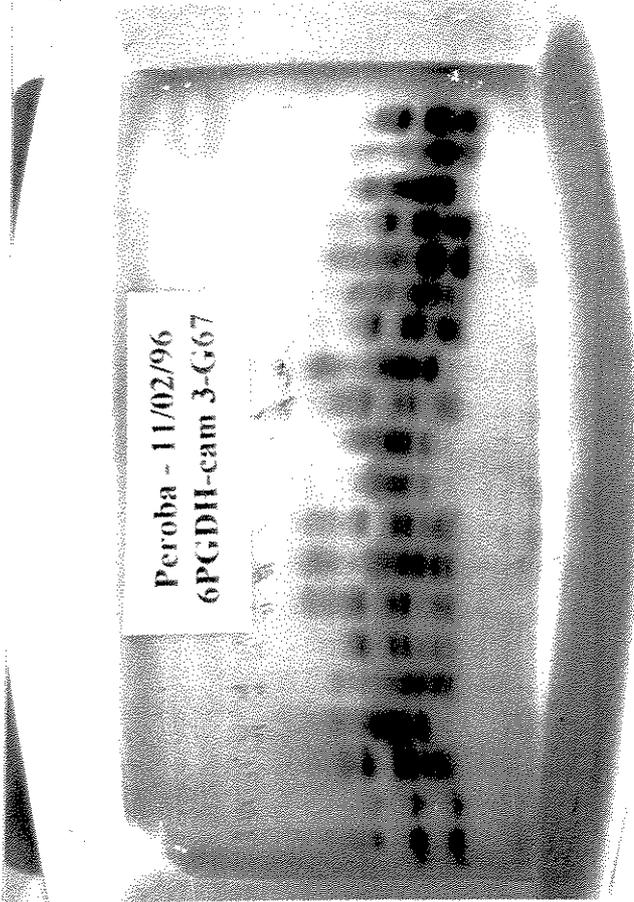
### ***Shiquimato desidrogenase (SKDH)***

Esta enzima também revelou uma zona de atividade, interpretada como um loco de estrutura monomérica. Este loco foi monomórfico considerando-se o critério de 95%. Entretanto, ao se considerar o critério de 99%, este loco apresentou polimorfismo, pois dois indivíduos da População 1 apresentaram heterozigotos com um alelo raro.

### ***Fosfoglucomutase (PGM)***

A interpretação desta enzima só foi possível para a amostra de indivíduos jovens. Para esta categoria apenas uma zona de atividade apareceu claramente em todos os géis. Esta zona foi interpretada como um loco polimórfico dialélico.

Na Figura 10, a seguir, podem ser observadas fotos de géis revelados para os 7 sistemas enzimáticos descritos acima.



**Figura 9:** Fotografias dos géis obtidos através de colorações específicas para os seguintes sistemas enzimáticos: 6-PGDH, PGI, LAP, MDH, PER, SKDH E PGM. Estes foram os sistemas enzimáticos utilizados para a obtenção das estimativas das frequências alélicas em duas populações de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*) na Estação Ecológica dos Caetetus (Gália-SP). Campinas - UNICAMP. 1997.

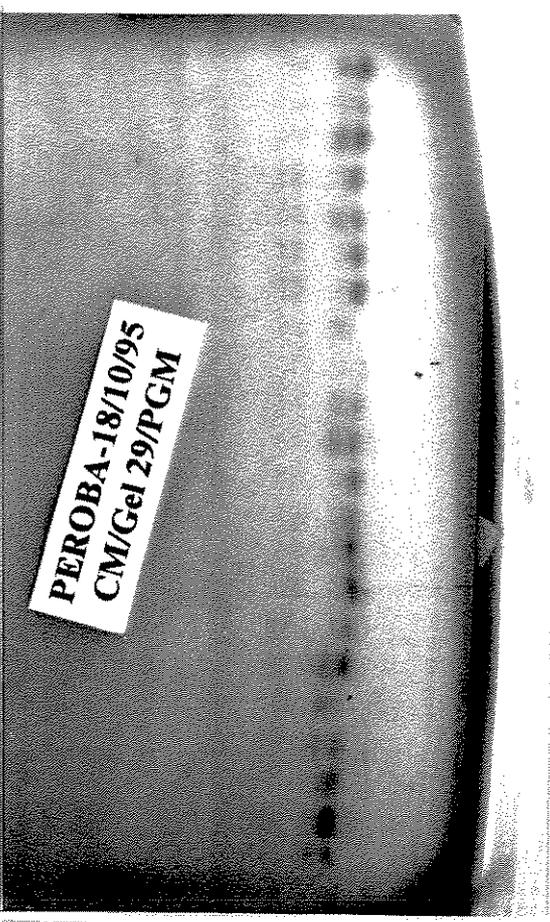
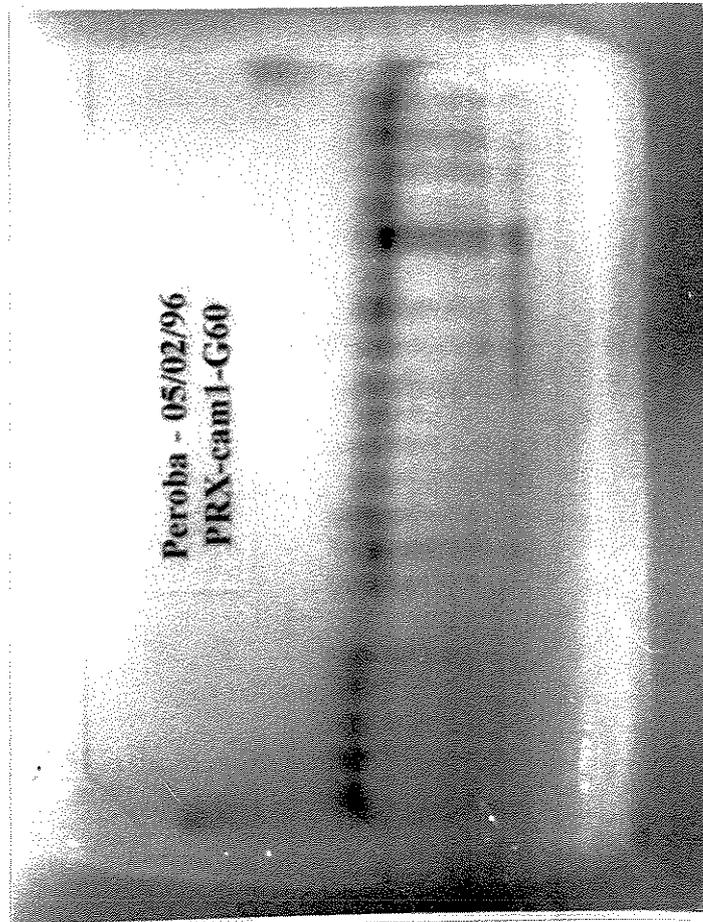
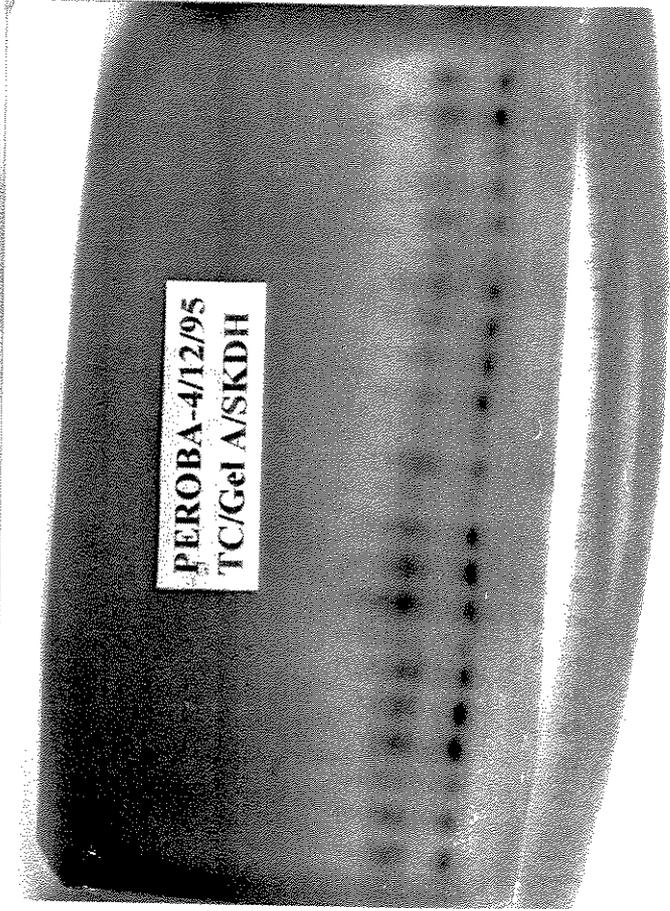
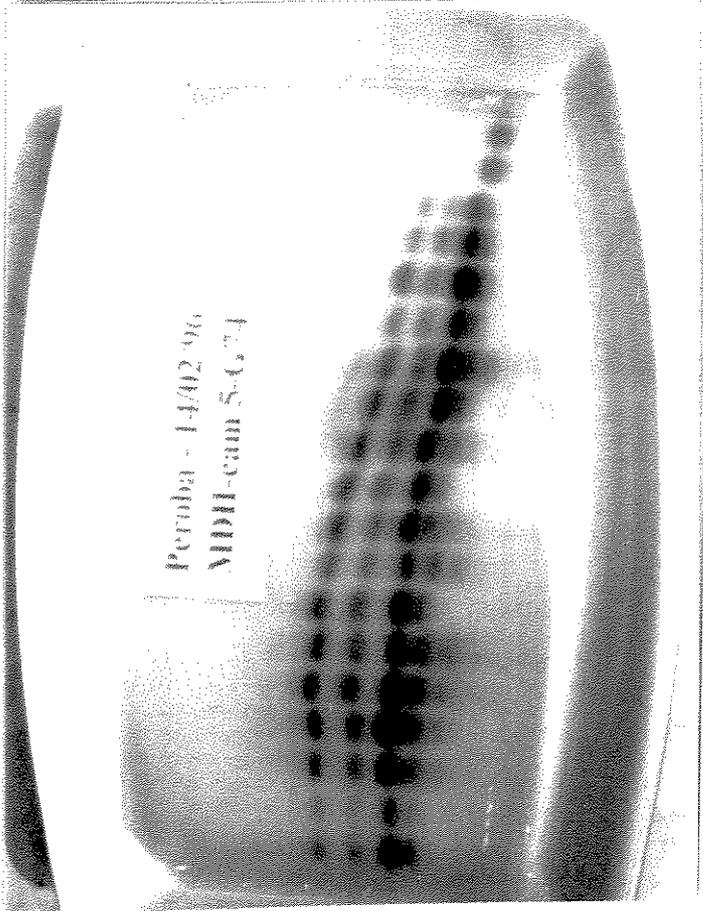


Figura 9: Continuação

## 5.6 Estrutura Genética

### 5.6.1 Para as Duas Populações de Indivíduos Adultos

#### 5.6.1.1 Frequências Alélicas, Polimorfismo, Número Médio de Alelos por Loco e Heterozigosidades Observada e Esperada

*Tabela 4: Número de indivíduos analisados por loco (n), frequências alélicas ( $\hat{p}_i$ ), e heterozigosidades observada e estimada ( $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$ ) em cada loco alozímico analisado nas Populações 1 e 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

	Loco	n	$\hat{p}_1$	$\hat{p}_2$	$\hat{p}_3$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>Lap-1</b>	61	0,090	0,123	0,787	0,344	0,361
<b>P<sub>2</sub></b>		50	0,010	0,570	0,420	0,300	0,504
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>Mdh-1</b>	63	1,000	-	-	-	0,000
<b>P<sub>2</sub></b>		53	1,000	-	-	-	0,000
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>Mdh-2</b>	63	1,000	-	-	-	0,000
<b>P<sub>2</sub></b>		53	1,000	-	-	-	0,000
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>Per-1</b>	63	1,000	-	-	-	0,000
<b>P<sub>2</sub></b>		53	1,000	-	-	-	0,000
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>6Pgdh-1</b>	62	0,032	0,734	0,234	0,274	0,409
<b>P<sub>2</sub></b>		52	0,010	0,846	0,144	0,231	0,266
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>6Pgdh-2</b>	62	0,444	0,556	-	0,500	0,498
<b>P<sub>2</sub></b>		53	0,462	0,538	-	0,846	0,502
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>Pgi-1</b>	63	0,135	0,476	0,389	0,794	0,609
<b>P<sub>2</sub></b>		51	0,412	0,255	0,333	0,784	0,661
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>Skdh</b>	60	0,983	0,017	-	0,033	0,033
<b>P<sub>2</sub></b>		53	1,000	-	-	-	0,000

P<sub>1</sub> - População 1

P<sub>2</sub> - População 2

Para o cálculo da porcentagem de locos polimórficos, foram utilizados 2 critérios: quando o alelo mais freqüente não atingia valores de freqüência superior a 95% e 99%. Desta forma, para os indivíduos adultos, dos oito locos estudados, 4 apresentaram-se monomórficos a 95% (Mdh-1, Mdh-2, Per-1 e Skdh-1), enquanto que a 99%, para a População 1, o loco Skdh-1 foi considerado polimórfico.

A estimativa da variabilidade genética foi obtida utilizando-se as freqüências dos 15 alelos encontrados na População 1 distribuídos em 8 locos e as freqüências dos 14 alelos encontrados na População 2 em 8 locos (Tabela 4). São também fornecidos  $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$  para cada loco.

A distribuição das freqüências alélicas nestas duas populações foi muito semelhante, com exceção dos locos Lap-1, no qual o alelo mais freqüente na População 1 foi o alelo 3 e na População 2 foi o alelo 2, e Pgi-1 que apresentou o alelo 2 seguido do alelo 3 como mais freqüentes, enquanto que na População 2 os alelos mais freqüentes foram, respectivamente, os alelos 1 e 3. As freqüências genotípicas para as duas populações estudadas encontram-se na Tabela 25 dos ANEXOS.

A Tabela 5, a seguir, mostra que as duas populações estudadas apresentaram estimativas muito semelhantes para os parâmetros de diversidade genética. As heterozigosidades esperadas e observadas médias ( $\hat{H}_e / \hat{H}_o$ ), considerando-se todos os locos foram, respectivamente, para as Populações 1 e 2, de 0,237/0,243 e 0,239/0,270. Considerando-se apenas os locos polimórficos, essas heterozigosidades passam a ser de 0,465/0,478 e 0,478/0,540, respectivamente.

Pode-se verificar, a princípio, que as heterozigosidades observadas são maiores do que as esperadas para ambas as populações, sendo essa diferença, entretanto, pequena. Visando testar se essa diferença é significativa, foram feitos os testes do  $\chi^2$  e exato de Fisher, obtendo-se os resultados descritos no item 5.6.1.2.

O número médio de alelos por loco polimórfico, assim como a taxa de polimorfismo (95%), foi semelhante para as duas populações estudadas, respectivamente de 2,75 e 50%.

*Tabela 5: Estimativas de diversidade genética, via marcadores alozímicos, para as Populações 1 e 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

	População 1	População 2
Heterozigosidade esperada média (todos os locos)	0,237 (0,090)*	0,239 (0,098)
Heterozigosidade esperada média (somente locos polimórficos)	0,465 (0,054)	0,478 (0,081)
Heterozigosidade observada média (todos os locos)	0,243 (0,104)	0,270 (0,126)
Heterozigosidade observada média (somente locos polimórficos)	0,478 (0,115)	0,540 (0,160)
Número médio de alelos por loco	2,00 (0,33)	1,88 (0,35)
Número médio de alelos por loco polimórfico	2,75 (0,25)	2,75 (0,25)
Porcentagem de locos polimórficos (critério 0,95)	50,00	50,00
Porcentagem de locos polimórficos (critério 0,99)	62,50	50,00

\* desvio padrão

#### 5.6.1.2 Verificação dos Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Equilíbrio de Endogamia de Wright

Nas Tabelas 6 e 7 podem ser observados os testes de  $\chi^2$  para verificação dos desvios das frequências genotípicas observadas com relação às frequências genotípicas esperadas sob o modelo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para as Populações 1 e 2, respectivamente. Quando houve significância utilizando-se os genótipos reais (não agrupados), foi feito o agrupamento em 3 classes, sendo: classe 1 - número de homozigotos, classe 2 - número de heterozigotos entre o alelo mais comum e os alelos raros e classe 3 - número de homozigotos raros e outros heterozigotos. Entretanto, em nenhum loco onde o agrupamento foi testado houve alteração no grau de significância; portanto são apresentados apenas os resultados para os genótipos reais. São também apresentados nessas Tabelas os resultados dos testes exatos de Fisher para os desvios do EHW ( $P_{\text{Fisher}}$ ).

*Tabela 6: Verificação da aderência das estimativas encontradas para 5 locos polimórficos ao modelo do EHW, através dos testes do  $\chi^2$  e exato de Fisher. População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	Genótipos	n <sub>o</sub>	n <sub>e</sub>	$\chi^2$	GL $\chi^2$	P $\chi^2$	P <sub>Fisher</sub>
Skd-1	1- 1	58	58,017	0,000	1	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>
	1- 2	2	1,967				
	2- 2	0	0,017				
Pgi-1	1- 1	2	1,147	13,741	3	0,003**	0,002**
	1- 2	7	8,095				
	1- 3	6	6,611				
	2- 2	8	14,286				
	2- 3	37	23,333				
	3- 3	3	9,528				
Lap-1	1- 1	0	0,496	1,134	3	0,769 <sup>ns</sup>	0,439 <sup>ns</sup>
	1- 2	3	1,352				
	1- 3	8	8,656				
	2- 2	1	0,922				
	2- 3	10	11,803				
	3- 3	39	37,770				
6Pgdh-1	1- 1	0	0,065	8,425	3	0,038*	0,023*
	1- 2	4	2,935				
	1- 3	0	0,935				
	2- 2	37	33,391				
	2- 3	13	21,282				
	3- 3	8	3,391				
6Pgdh-2	1- 1	12	12,198	0,000	1	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>
	1- 2	31	30,605				
	2- 2	19	19,198				

n<sub>o</sub> - número observado

n<sub>e</sub> - esperado

GL - graus de liberdade

P - probabilidade de ajuste para a distribuição dos  $\chi^2$

\* P<0.05 e \*\* P<0.01

ns - não significativo

*Tabela 7: Verificação da aderência das estimativas encontradas para 4 locos polimórficos ao modelo do EHW, através dos testes do  $\chi^2$  e exato de Fisher. População 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	Genótipos	n <sub>o</sub>	n <sub>e</sub>	$\chi^2$	GL $\chi^2$	P $\chi^2$	P <sub>Fisher</sub>
Pgi-1	1- 1	2	8,647	13,741	3	0,003**	< 0,001**
	1- 2	8	10,706				
	1- 3	30	14,000				
	2- 2	8	3,314				
	2- 3	2	8,667				
	3- 3	1	5,667				
Lap-1	1- 1	0	0,005	7,320	3	0,062 <sup>ns</sup>	0,008**
	1- 2	1	0,570				
	1- 3	0	0,420				
	2- 2	21	16,245				
	2- 3	14	23,940				
	3- 3	14	8,820				
6Pgdh-1	1- 1	0	0,005	0,276	3	0,965 <sup>ns</sup>	0,329 <sup>ns</sup>
	1- 2	1	0,846				
	1- 3	0	0,114				
	2- 2	38	37,231				
	2- 3	11	12,692				
	3- 3	2	1,082				
6Pgdh-2	1- 1	2	11,077	23,579	1	0,000**	< 0,001**
	1- 2	44	25,846				
	2- 2	6	15,077				

n<sub>o</sub> - número observado

n<sub>e</sub> - número esperado

GL - graus de liberdade

P - probabilidade de ajuste para a distribuição dos  $\chi^2$

\* P<0.05 e \*\* P<0.01

ns - não significativo

Para ambas as populações estudadas, foi considerado mais seguro o uso do teste exato de Fisher para os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a ocorrência generalizada de células com valores inferiores a 5 para n<sub>e</sub> (com exceção do loco 6Pgdh-2). Entretanto, com exceção do loco Lap-1 na População 2, ambos os testes realizados apresentaram os mesmos resultados.

Para a População 1, a hipótese nula de adequação ao modelo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi rejeitada em 2 locos (Pgi-1 e 6Pgdh-2). Para a População 2, somente 1 dos 4 locos analisados apresentou-se em EHW pelo teste de Fisher (6Pgdh-1), enquanto que, pelo teste do  $\chi^2$ , dois locos rejeitaram a hipótese nula (Pgi-1 e 6Pgdh-2) e dois a aceitaram (Lap-1 e 6Pgdh-1).

Conforme mencionado anteriormente, para o loco Lap-1 da População 2, deve ser priorizado o teste de Fisher, pelo qual o loco não se encontra em EHW, devido 50% das classes de números esperados serem inferiores a 1, conforme explicado por LEPSCH-CUNHA (1996).

Dentre os locos que não se apresentaram em EHW, somente 6Pgdh-1 (na População 1) e Lap-1 (na População 2) puderam ser testados quanto à adequação ao modelo do Equilíbrio de Endogamia de Wright - EEW (Tabela 8). Para os demais locos que não se ajustaram ao modelo do EHW, ou os graus de liberdade foram insuficientes para a realização do teste, ou, devido ao excesso de heterozigotos, o desvio do EHW não pode ser explicado pela presença de endogamia.

Em relação aos dois locos analisados para o desvio do EEW, os resultados do teste de  $\chi^2$  não foram significativos, indicando que a endogamia encontrada nestes locos pode estar ocorrendo devido a um sistema misto de cruzamento, com uma certa taxa de autofecundação ou cruzamento entre aparentados. Entretanto, este resultado deve ser visto com cautela, pois há grande quantidade de células de números esperados com valores menores do que 1. Conforme discutido por LEPSCH-CUNHA (1996), seria necessário o desenvolvimento de testes exatos, como o teste de Fisher, realizado para verificação de EHW, ou com os genótipos agrupados, para verificação deste modelo de equilíbrio com endogamia.

*Tabela 8: Verificação da aderência das estimativas encontradas para os locos 6Pgdh-1 (População 1) e Lap-1 (População 2) ao modelo do Equilíbrio de Endogamia de Wright, através do teste  $\chi^2$ . Populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

<b>População 1</b>						
<b>Loco</b>	<b>Genótipo</b>	<b>n<sub>o</sub></b>	<b>n<sub>e</sub></b>	<b>GL</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
<b>6Pgdh-1</b>	1-1	0	0,686			
	1-2	4	1,969			
	1-3	0	0,628			
	2-2	37	37,325			
	2-3	13	14,397			
	3-3	8	6,996			
					2	3,691
<b>População 2</b>						
<b>Loco</b>	<b>Genótipo</b>	<b>n<sub>o</sub></b>	<b>n<sub>e</sub></b>	<b>GL</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	
<b>Lap-1</b>	1-1	0	0,202			
	1-2	1	0,343			
	1-3	0	0,253			
	2-2	21	21,122			
	2-3	14	14,412			
	3-3	14	13,668			
					2	1,733

n<sub>o</sub> - número observado  
n<sub>e</sub> - número esperado  
GL - graus de liberdade  
ns - não significativo

### 5.6.1.3 Índices de Fixação de Wright (F)

Na Tabela 9, a seguir, podem ser observadas as estimativas obtidas para o índice de fixação dos locos analisados. Os desvios apresentados pelos locos na População 1 foram, em Pgi-1 para excesso de heterozigotos, enquanto que em 6Pgdh-1 o desvio foi para excesso de homozigotos. A média obtida para todos os locos (0,025), por sua vez, não foi estatisticamente significativa.

*Tabela 9: Número de heterozigotos observados e esperados, índices de fixação de Wright e teste de  $\chi^2$  de LI e HORVITZ (1953) para os 5 locos alozímicos polimórficos analisados na População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	n° de heterozigotos observados	n° de heterozigotos esperados	$\hat{F}$	$\chi^2$	P
Skdh-1	2	1,967	-0,017	0,017 (1)	0,896 <sup>ns</sup>
Pgi-1	50	38,040	-0,314	12,420 (3)	0,006**
Lap-1	21	21,811	0,037	0,167 (3)	0,983 <sup>ns</sup>
6Pgdh-1	17	25,153	0,324	13,017 (3)	0,005**
6Pgdh-2	31	30,605	-0,013	0,011 (1)	0,916 <sup>ns</sup>
Média			0,025	0,0397 (1)	0,842 <sup>ns</sup>

Os graus de liberdade encontram-se entre parênteses.

Para a População 2, a significância do desvio do EHW, obtida através do índice de fixação F (Tabela 10), foi coerente com os desvios encontrados anteriormente via  $\chi^2$  para os número observados e esperados para os genótipos (Tabela 7), com exceção do loco Pgi-1, cujo desvio do EHW foi significativo nos testes anteriores e não significativo via F. Conforme sugerido por LEPSCH-CUNHA (1996), isto pode estar ocorrendo devido ao tamanho amostral, que influi muito sobre o teste de  $\chi^2$  para o índice de fixação com o aumento do valor de F, tornando o teste tendencioso no sentido de aceitar a hipótese nula de equilíbrio de Hardy-Weinberg mesmo com valores elevados de F. Os desvios do EHW, para esta população, foram para excesso de homozigotos para a o Lap-1 e excesso de heterozigotos para 6Pgdh-1. Da mesma forma do que para a População 1, a média de F obtida para todos os locos (0,025) não foi estatisticamente significativa.

Pode-se observar que, apesar dos diferentes magnitudes de significância para as duas populações estudadas, a tendência para os locos Pgi-1 e 6Pgdh-2 é o desvio do EHW para excesso de heterozigotos, enquanto que para os locos Lap-1 e 6Pgdh-1 o desvio tende a ser para excesso de homozigotos.

**Tabela 10:** Número de heterozigotos observados e esperados, índices de fixação de Wright e teste de  $\chi^2$  de LI e HORVITZ (1953) para os 4 locos alozímicos polimórficos analisados na População 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

Loco	n° de heterozigotos observados	n° de heterozigotos esperados	$\hat{F}$	$\chi^2$	P
Pgi-1	40	33,373	-0,199	4,039 (3)	0,257 <sup>ns</sup>
Lap-1	15	24,930	0,398	15,84 (3)	0,001**
6Pgdh-1	12	13,683	0,123	1,573 (3)	0,665 <sup>ns</sup>
6Pdh-2	44	25,846	-0,702	25,626 (1)	<0,001**
Média			-0,130	0,877 (1)	0,349 <sup>ns</sup>

Os graus de liberdade encontram-se entre parênteses.

#### 5.6.1.4 Distâncias Genéticas Entre as Populações 1 e 2 e Fluxo Gênico

A distância genética entre as populações 1 e 2 foi estimada através da Estatística F de Wright (WRIGHT, 1965), obtendo-se um  $\hat{F}_{ST}$  de 0,61 para a média dos 5 locos analisados (Tabela 11).

**Tabela 11:** Estimativas dos Índices de Fixação de Wright ( $\hat{F}_{IS}$ ,  $\hat{F}_{IT}$  e  $\hat{F}_{ST}$ ) para as duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

Loco	$\hat{F}_{IS}$	$\hat{F}_{IT}$	$\hat{F}_{ST}$
Skdh-1	-0,017	-0,008	0,008
Pgi-1	-0,254	-0,193	0,049
Lap-1	0,248	0,372	0,166
6Pgdh-1	0,245	0,257	0,016
6Pgdh-2	-0,359	-0,358	0,000
Média	-0,079	-0,013	0,061

O resultado obtido através da abordagem de populações subdivididas de NEI (1973) (Tabela 12) foi muito semelhante ao obtido através do  $\hat{F}_{ST}$ , ambos indicando pequena diferenciação entre as populações analisadas.

*Tabela 12: Estimativas de  $H_T$ ,  $H_S$ ,  $D_{ST}$  e  $G_{ST}$  em duas populações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	$\hat{p}_1$	$\hat{p}_2$	$\hat{p}_3$	$\hat{H}_T$	$\hat{H}_S$	$\hat{D}_{ST}$	$\hat{G}_{ST}$
Lap-1	0,054	0,324	0,622	0,505	0,421	0,084	0,167
Mdh-1	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Mdh-2	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Per-1	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pgi-1	0,259	0,377	0,364	0,658	0,626	0,032	0,048
6Pgdh-1	0,022	0,785	0,193	0,346	0,341	0,005	0,015
6Pgdh-2	0,452	0,548	0,000	0,495	0,495	0,000	0,000
Skdh-1	0,991	0,009	0,000	0,018	0,018	0,000	0,008
<b>Média</b>				0,253	0,238	0,015	0,060

$\hat{p}_i$  = frequência do alelo i juntando-se as duas populações

$\hat{H}_T$  = estimativa da heterozigosidade total

$\hat{H}_S$  = estimativa da heterozigosidade dentro das populações

$\hat{D}_{ST} = \hat{H}_T - \hat{H}_S$

$\hat{G}_{ST} = \hat{D}_{ST} / \hat{H}_T$  (proporção da heterozigosidade que se encontra entre as populações)

Uma terceira abordagem, a identidade genética não viesada de NEI (1978), foi calculada através do programa BIOSYS para as populações 1 e 2, obtendo-se por resultado o valor de 0,962, que corrobora o resultado obtido através dos estimadores anteriores.

A taxa de fluxo gênico encontrada a partir da estimativa de  $G_{ST}$ , conforme metodologia descrita por CROW e AOKI (1984) foi de 0,98 indivíduos por geração.

### 5.6.1.5 Taxa de Cruzamento Aparente

Os resultados obtidos para a taxa de cruzamento aparente para as Populações 1 e 2 estudadas, foram de, respectivamente, 0,82 e 0,90. Esses resultados indicam uma alta taxa de cruzamento, reforçando o pressuposto inicial de que *A. polyneuron* é uma espécie preferencialmente alógama. Entretanto, esse resultado deve ser visto com cautela devido à pequena amostragem de locos, às

limitações referentes ao teste do EEW (6Pgdh-1 da População 1 e Lap-1 da População 2) e à limitações do modelo. Segundo REIS (1996), o emprego de modelos multilocos permite a obtenção de estimativas mais adequadas da taxa de cruzamento, pois levam em consideração as combinações genotípicas envolvendo todos os locos. Entretanto tal metodologia não pôde ser aplicada no presente trabalho devido não ter sido possível a coleta de sementes.

### 5.6.2 Para a Amostra de Indivíduos Jovens

#### 5.6.2.1 Frequências Alélicas, Polimorfismo, Número Médio de Alelos por Loco e Heterozigosidades Observada e Esperada

Da mesma forma como foi feito para os indivíduos adultos, obteve-se as estimativas da variabilidade genética, através dos marcadores alozímicos para a amostra de indivíduos jovens. Na Tabela 13 constam as frequências dos 11 alelos encontrados nesta amostra, distribuídos em 6 locos, a saber Lap-1, Mdh-1, Mdh-2, Per-1, Pgi-1 e Pgm-1. Dos 6 locos analisados, 3 apresentaram-se invariáveis: Mdh-1, Mdh-2 e Per-1. São também fornecidas as  $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$  cada loco.

*Tabela 13: Número de indivíduos analisados por loco (n), frequências alélicas ( $\hat{p}_i$ ), e heterozigosidades observada e estimada ( $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$ ) para cada loco analisado na amostra de indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) da População 1. Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	n	$\hat{p}_1$	$\hat{p}_2$	$\hat{p}_3$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$
Lap-1	225	-	0,329	0,671	0,578	0,441
Mdh-1	233	1,000	-	-	0,000	0,000
Mdh-2	233	1,000	-	-	0,000	0,000
Per-1	233	1,000	-	-	0,000	0,000
Pgi-1	226	0,066	0,500	0,434	0,558	0,757
Pgm-1	206	0,345	0,655	0,000	0,452	0,453

As frequências genóticas nos locos da amostra de indivíduos jovens encontram-se na Tabela 26 dos ANEXOS, enquanto que a estimativa da diversidade genética através do polimorfismo, número de alelos por loco e heterozigosidades observada e esperada encontra-se na Tabela 14, a seguir:

*Tabela 14: Estimativas de diversidade genética, via marcadores alozímicos, na amostra de indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) da População 1 na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Heterozigosidade esperada média (todos os locos)	0,242 (0,109)*
Heterozigosidade esperada média (somente locos polimórficos)	0,485 (0,037)
Heterozigosidade observada média (todos os locos)	0,321 (0,146)
Heterozigosidade observada média (somente locos polimórficos)	0,642 (0,057)
Número médio de alelos por loco	1,67 (0,33)
Número médio de alelos por loco (somente os locos polimórficos)	2,33 (0,33)
Porcentagem de locos polimórficos (critérios 95% e 99%)	50,00

\* desvio padrão

O número médio de alelos por loco polimórfico (2,33) foi ligeiramente maior do que o encontrado para os indivíduos adultos da População 1. As heterozigosidades esperada e observada médias, considerando todos os locos e somente os locos polimórficos, foram, respectivamente, de 0,242/0,321 e 0,485/0,642. Enquanto que a heterozigosidade esperada esteve muito próxima da obtida para a População 1 de indivíduos adultos, 0,242 e 0,237, respectivamente para jovens e adultos, a heterozigosidade observada foi sensivelmente maior para os indivíduos jovens (0,321 e 0,243).

#### 5.6.2.2 Verificação dos Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Da mesma forma que para os indivíduos adultos, foram feitos os testes de  $\chi^2$  e teste exato de Fisher visando verificar a adequação das frequências genóticas observadas ao modelo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os locos polimórficos da amostra de indivíduos jovens de *A. polyneuron*. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 15, a seguir.

*Tabela 15: Verificação da aderência das estimativas encontradas para três locos polimórficos ao modelo do EHW, através dos testes do  $\chi^2$  e exato de Fisher. Amostra de indivíduos jovens da População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	Genótipos	n <sub>o</sub>	n <sub>e</sub>	$\chi^2$	G $\chi^2$	P $\chi^2$	P <sub>Fisher</sub>
Pgi-1	1- 1	8	0,996	110,463	3	0,000**	< 0,001**
	1- 2	7	15,000				
	1- 3	7	13,009				
	2- 2	31	56,500				
	2- 3	157	98,000				
	3- 3	16	42,496				
Lap-1	1- 1	9	24,338	20,386	1	0,000**	< 0,001**
	1- 2	130	99,324				
	2- 2	86	101,338				
Pgm-1	1- 1	10	24,471	18,875	1	0,000**	< 0,001**
	1- 2	122	93,058				
	2- 2	74	88,471				

n<sub>o</sub> - número observado

n<sub>e</sub> - número esperado

GL - graus de liberdade

P - probabilidade de ajuste para a distribuição dos  $\chi^2$

\* P<0.05 e \*\* P<0.01

ns - não significativo

Em ambos os testes, ficou evidente o desvio significativo em relação à panmixia, no sentido de um excesso de heterozigotos, em todos os locos analisados.

### 5.6.2.3 Índices de Fixação de Wright (F)

O resultado obtido na análise estatística dos índices de fixação de Wright para a amostra de indivíduos jovens (Tabela 16) evidenciou um excesso de heterozigotos, tanto considerando-se os locos individuais quanto para a média dos três locos analisados, confirmando o teste de  $\chi^2$  para genótipos observados e esperados (Tabela 15).

*Tabela 16: Número de heterozigotos observados e esperados, índices de fixação de Wright e teste do  $\chi^2$  de LI e HORVITZ (1953) para os 3 locos alozímicos polimórficos analisados na amostra de indivíduos jovens da População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

<b>Loco</b>	<b>Heterozigotos observados</b>	<b>Heterozigotos esperados</b>	<b><math>\hat{F}</math></b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
Pgi-1	171	126,01	-0,357	57,607 (3)	< 0,001**
Lap-1	130	99,32	-0,309	21,483 (1)	< 0,001**
Pgm-1	122	93,06	-0,311	19,925 (1)	< 0,001**
Média			-0,326	23,274 (1)	< 0,001**

os graus de liberdade encontram-se entre parênteses

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Levantamento da População e Enxertia das Estacas

As taxas de pegamento dos enxertos de *A. polyneuron* (14% e 3,3% para as Populações 1 e 2, respectivamente) foram baixas quando comparada com as obtidas por GANDARA (1993) e GIMENEZ (1973, citado por GANDARA, 1993), respectivamente de 46% para *Cedrela fissilis* e 59% para *Cedrela odorata*. Este parece constituir, entretanto, um método interessante para propagação vegetativa dos genótipos de interesse em estudos genéticos, propagação massal de indivíduos selecionados ou conservação *ex situ*. Porém, alguns cuidados devem ser tomados, tais como observar a época de coleta das estacas e executar um número de repetições para cada indivíduo amostrado que garanta pelo menos uma muda com o mesmo genótipo de cada um desses indivíduos.

No que se refere à melhor época para a realização de enxertias nesta espécie, obteve-se, neste trabalho, melhores resultados (População 1) quando as enxertias foram feitas no inverno (junho), do que quando foram feitas no verão (novembro), com taxas de pegamento de 14% e 3,3%, respectivamente.

Por outro lado, os testes evidenciaram não haver nenhuma influência da enxertia sobre a produção de alozimas pela folhas da muda enxertada obtida, sendo este procedimento recomendável quando a população estudada se encontra distante do laboratório onde serão realizadas as análises alozímicas.

A ocorrência de 5 árvores florescendo entre novembro e dezembro confirma as informações fornecidas na bibliografia disponível (CARVALHO, 1994; MORELLATO, 1991 e RIZZINI, 1990). No período do estudo, foi muito baixa a ocorrência de evento reprodutivo nas populações estudadas, concordando com a bibliografia que indica que esta espécie não frutifica de forma abundante anualmente. Portanto, observações fenológicas de espécies arbóreas tropicais devem ser feitas por um período longo, de no mínimo 3 anos consecutivos, e de forma sistemática, para que se obtenha uma conclusão consistente. Não sendo este o objetivo do presente trabalho, tais observações são de ordem complementar e ilustrativa.

A baixa ocorrência dos eventos reprodutivos, assim como a sua assincronia dentro das populações, pode ter implicações sobre a estrutura genética da espécie, na medida em que fica variável o tamanho efetivo populacional a cada evento reprodutivo. Portanto, estudos sobre o sistema reprodutivo e taxa de cruzamento envolvendo essas variáveis são pertinentes, principalmente em espécies que apresentem grande variação anual nos eventos reprodutivos. Tais estudos devem ser feitos em vários eventos reprodutivos, durante alguns anos seguidos.

## 6.2 Densidade e Distribuição Espacial

A densidade encontrada para as duas populações de *A. polyneuron* estudadas, respectivamente de 7,9 e 6,6 indivíduos/ha, concorda com as informações obtidas em levantamentos fitossociológicos em florestas estacionais semidecíduais do interior de São Paulo, nos quais a densidade variou de 7,5 ind./ha (PAGANO e LEITÃO FILHO, 1987) a 36 ind./ha (TABANEZ, 1995). Estes dados evidenciam que esta espécie, nessas populações, não é rara (menos que um indivíduo por hectare). Por outro lado, em populações não perturbadas, sua densidade não costuma ultrapassar 35 indivíduos/ha, não podendo ser caracterizada como uma espécie comum como, por exemplo, o palmiteiro, que apresentou densidade entre 54 e 262 indivíduos/ha nas populações estudadas por REIS (1996).

Portanto, trata-se de uma espécie de densidade intermediária que pode, em algumas situações, tornar-se comum, como na floresta secundária estudada por RODRIGUES et al. (submetido) onde 217 indivíduos/ha foram encontrados. Um dos fatores que parece atuar no sentido de aumentar a densidade de *A. polyneuron* é a ação antrópica. Entretanto, um aumento no número de indivíduos não significa necessariamente a conservação da variabilidade genética da espécie ou prevenção de endogamia. MORAES (1992), por exemplo, analisou progênies de populações de *Myracrodruon urundeuva*, uma espécie arbórea que na sucessão apresenta-se como secundária, que ocupa o dossel da floresta, é dióica e ocorre naturalmente em baixa densidade na floresta primária, tornando-se comum em áreas perturbadas. Valores elevados foram encontrados para o índice de fixação ( $F$  de Wright) tanto para a espécie ( $F_{IT} = 0,513$ ), quanto para as populações ( $F_{IS} = 0,495$ ) de *M. urundeuva* em área perturbada. Neste caso, portanto, o aumento da densidade de indivíduos não esteve associado a níveis baixos de endogamia. MORAIS (1992) sugere que esse resultado foi encontrado devido ao efeito “gargalo de

garrafa” causado pela fundação destas populações por poucos indivíduos e o consequente cruzamento entre aparentados.

A distribuição espacial encontrada para as Populações 1 e 2, respectivamente, agregada e aleatória, mostra que não existe um padrão definido de distribuição espacial para esta espécie, sendo que este padrão deve flutuar ao longo das gerações. Um dos fatores que pode ter influenciado a distribuição espacial dos indivíduos é a ação antrópica, principalmente na População 2, que esteve provavelmente mais sujeita a esse tipo de perturbação.

As implicações genéticas geradas pelo padrão de densidade se referem, principalmente, ao sistema de cruzamento, ou seja, ao fluxo de pólen. A pequena distância média encontrada entre os indivíduos reprodutivos de *A. polyneuron* não deve, a princípio, representar limitação para o movimento de polinizadores.

Os resultados encontrados sugerem que o padrão atual de distribuição da diversidade genética nas populações de indivíduos adultos, em conjunto com as características atuais de estrutura das populações, mesmo havendo um padrão supra-anual de reprodução, são capazes de gerar uma regeneração intensa e com elevada diversidade genética.

### **6.3 Distribuição de Tamanho**

Conforme pode ser observado nas Figuras 5 e 6, a curva de distribuição diamétrica de ambas as populações de indivíduos adultos, principalmente da População 2, não apresentou o padrão esperado para espécies em equilíbrio demográfico segundo MARTINS (1991), ou seja, em J invertido. Enquanto que a População 1 apresentou um número acima do esperado para a classe entre 70 e 80 cm de DAP, a População 2, por outro lado, apresentou poucos indivíduos na primeira classe (entre 8 e 20 cm de DAP). A amostra de indivíduos jovens, por sua vez, apresentou exatamente o padrão esperado, com um número de indivíduos de menor diâmetro muito maior do que nas demais classes.

Vale ressaltar que não foram registrados indivíduos com altura superior a 3 m e DAP inferior a 8 cm nas duas populações estudadas. Duas hipóteses podem ser sugeridas para explicar esse resultado. A primeira diz respeito à amostragem. Se, por um lado, em uma área amostral de 8 hectares a visualização no campo de indivíduos menores do que 8 cm se torna difícil, a amostra de indivíduos jovens

(de 750 m<sup>2</sup>) é insuficiente para a captura de indivíduos com altura acima de 3 m. A amostragem adequada de indivíduos nessa classe de tamanho exigiria o uso de parcelas menores do que 8 ha e maiores do que 750 m<sup>2</sup>. Por outro lado, é possível que nessa classe intermediária de tamanho (maior do que 3 m de altura e DAP inferior a 8 cm), existam efetivamente muito poucos indivíduos em áreas naturais. Afinal, como a espécie é muito longeva, basta que poucos indivíduos tenham sucesso em atingir o estágio adulto para garantir uma densidade que garanta a regeneração e manutenção de populações com alta diversidade genética a longo prazo. Este modelo se aplicaria para espécies longevas e com densidade baixa ou intermediária.

Os diferentes resultados encontrados para as duas populações de indivíduos adultos sugere que as áreas onde estão locadas as populações analisadas têm um histórico diferenciado de perturbação. A População 2 encontra-se próxima à borda da floresta, portanto em uma área mais sujeita à perturbação, tanto via extração de madeira, quanto via efeito de borda. Assim, a curva encontrada para a População 2 indica que pode ter havido corte seletivo de indivíduos de grande porte (reprodutivos) em tempos passados. Este desbaste pode ter ocasionado uma deficiência na produção de sementes durante alguns anos e, conseqüentemente, um pequeno recrutamento, gerando uma deficiência de indivíduos na classes entre 8 e 20 cm na população atual.

Por outro lado, a População 1 encontra-se em uma área no interior da floresta, com baixos indícios de perturbação, e onde, segundo o relato de mateiros, não houve extração de madeira. O padrão de distribuição diamétrica encontrado para esta População deve corresponder à dinâmica natural da espécie. Ou seja, mesmo para as classes de maior diâmetro, há uma variação no número de indivíduos, retratando diferenças na intensidade de recrutamento em épocas passadas.

SCHLITTLER (1990) construiu uma curva de distribuição diamétrica para *A. polyneuron* com a amostragem feita na floresta do Morro do Diabo, em Teodoro Sampaio-SP. Houve ausência de indivíduos nas classes de menor diâmetro, grande interrupções nas classes intermediárias e predominância em apenas uma classe (entre 70 e 75 cm de DAP). O autor associou esta curva com a ausência de regeneração natural da espécie. Caso esta explicação seja verdadeira, tal ausência de regeneração deve ter ocorrido há muito tempo, pois o menor indivíduo amostrado por este autor encontra-se na classe de diâmetro entre 15 e 20 cm. SCHLITTLER (1990) encontrou para outras espécies como *Cedrela fissilis*, *Balfourodendron riedelianum*, *Chrysophyllum gonocarpum* e *Nectandra megapotamica* padrões parecidos, mas com maior frequência de indivíduos nas classes

intermediárias de DAP. Levando em consideração a curva construída para a População 2 do presente estudo, percebe-se que esse padrão tende a se repetir, gerando uma segunda hipótese que sugere que este padrão pode não significar um desequilíbrio na dinâmica do recrutamento dessas espécies, mas sim a sua dinâmica natural, capaz de manter as populações. Por outro lado CESAR e LEITÃO FILHO (1990) observaram indivíduos de *A. polyneuron* nos diversos estratos por eles analisados na fazenda Barreiro Rico em Anhembi-SP, assim como GALVÃO et al. (1989) na Foresta Nacional de Irati em Teixeira Soares-PR, o que reforça a observação em relação à Estação Ecológica dos Caetetus que indica uma elevada capacidade de regeneração desta espécie.

Conforme evidenciam os resultados encontrados, ocorrem simultaneamente e com possibilidade de cruzamento, indivíduos reprodutivos com diversos tamanhos de DAP (diversas idades), ou seja, oriundos de eventos reprodutivos completamente diferentes. A migração de alelos de indivíduos de outras populações que já não existem, a alteração do meio ambiente biótico e abiótico durante este período, a flutuação na densidade, são eventos que podem ter sido vivenciados diferentemente pelos indivíduos atualmente presentes nas populações. Esta composição diamétrica da população gera a possibilidade de cruzamento entre indivíduos que jamais o fariam caso a espécie fosse de ciclo curto. Estas questões evidenciam o papel relevante da sobreposição de gerações na formação da estrutura genética atual de populações de espécies arbóreas.

## 6.4 Estrutura Genética

A heterozigiosidade total (para a espécie) encontrada nos adultos foi elevada, se comparada com os resultados encontrados em outras espécies arbóreas tropicais alógamas já estudadas via marcadores alozímicos (Tabela 22 dos ANEXOS). REIS (1996), em uma revisão de trabalhos já realizados por diversos autores, encontrou uma estimativa para a heterozigiosidade total ( $\hat{H}_T$ ) média de 0,146 para 82 espécies arbóreas tropicais (considerando todos os locos amostrados). No presente estudo, *A. polyneuron* apresentou o valor médio de  $\hat{H}_T = 0,257$ .

HAMRICK (1983), analisando 122 estudos com diferentes taxa encontrou uma maior heterozigiosidade ( $\hat{H}_T$ ) para espécies que possuem modos de reprodução sexual e assexual do que para aquelas que apresentam apenas um desses modos de reprodução. Esta hipótese reforça o pressuposto

de que alguns dos embriões formados nas sementes poliembriônicas de *A. polyneuron* são de origem materna, ou seja, apomíticos. A elevada heteroziguidade estaria associada, portanto, ao modo de reprodução da espécie.

Da mesma forma que o encontrado para a espécie, dentro das populações as heteroziguidades esperadas (diversidade gênica) e observadas encontram-se acima da média observada para as espécies arbóreas tropicais estudadas até o momento (Tabela 22 dos ANEXOS). As heteroziguidades observadas e esperadas foram, para as Populações 1 e 2 de indivíduos adultos e para a amostra de indivíduos jovens de, respectivamente, 0,243/0,237, 0,270/0,239 e 0,321/0,242. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por GANDARA (1996) que, estudando uma população natural de *Cedrela fissilis*, uma espécie arbórea tropical rara (1 indivíduo a cada 8 hectares), anemocórica e com síndrome de polinização que sugere ser esta espécie polinizada por pequenos insetos, encontrou uma diversidade gênica ( $\hat{H}_e$ ) para todos os locos estudados de 0,243 e polimorfismo de 76,9%.

As heteroziguidades observadas nas duas populações e nos indivíduos jovens foram bastante semelhantes. Em todos os casos houve uma maior heteroziguidade observada do que esperada, sendo os índices médios de fixação (F de Wright) respectivos de 0,025; -0,130 e -0,326. Somente na amostra de indivíduos jovens esse índice de fixação médio foi significativo, evidenciando um excesso de heterozigotos nesta categoria. Nos adultos, em contrapartida, índices médios de fixação não foram significativos de acordo com o teste de LI e HORVITZ (1953). As populações de indivíduos adultos apresentaram, portanto, menor excesso de heterozigotos do que a amostra de indivíduos jovens.

Os outros índices de diversidade, tais como o número médio de alelos por loco e o polimorfismo, foram muito próximos à média encontrada para as espécies arbóreas tropicais já estudadas (Tabela 22 dos ANEXOS).

A hipótese inicial de que em *A. polyneuron* a diversidade genética seria alta, devido ao provável fluxo gênico a longa distância e à polinização cruzada, veio a ser confirmada pelos dados encontrados neste trabalho.

Os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrados para diversos locos nas 2 populações estudadas indicam que estas populações não estão se cruzando panmiticamente e/ou que estão sofrendo ação de forças evolutivas, tais como migração, seleção ou deriva genética, que estão alterando a frequência esperada para os genótipos. Por outro lado, como salientado por LEPSCH-CUNHA (1996)

e encontrado pela autora para duas espécies de *Couratari*, a não congruência dos valores de F para os diversos locos analisados, ou seja, a obtenção de valores positivos e negativos ao mesmo tempo, evidenciam que outras forças evolutivas, que não o sistema reprodutivo ou seleção diferencial para heterozigotos, estão atuando.

Esses valores heterogêneos de F nos diferentes locos estudados nos indivíduos adultos, indicam a necessidade de se aumentar a amostragem de locos para uma análise mais minuciosa e segura dos fenômenos envolvidos na definição da estrutura genética nestas populações. Uma das hipóteses que poderia explicar a heterogeneidade encontrada para os índices de fixação é a ligação entre algum dos locos analisados a algum outro loco não neutro e sujeito, portanto, à seleção.

Observando-se a estimativa de  $F_{IT}$  para as duas populações de indivíduos adultos analisadas em conjunto ( $\hat{F}_{IT} = -0,013$ ), verifica-se que este não indica endogamia, da mesma forma que o encontrado para os índices médios de fixação das Populações 1 e 2 separadamente.

Os resultados encontrados para a amostra de indivíduos jovens, por outro lado, apresentaram grande coerência entre os locos estudados, indicando a adequação da amostragem para as análises realizadas. A diversidade gênica encontrada foi alta ( $\hat{H}_e = 0,242$  - todos os locos) e muito semelhante à obtida para a População 1 da qual foi amostrada. Esta comparação deve, entretanto, ser cuidadosa pois locos diferentes foram analisados.

O F médio encontrado para os jovens foi representativo dos locos estudados e indica um excesso de heterozigotos nesta categoria ( $\hat{F} = -0,326$ ), havendo rejeição da hipótese inicial de que os indivíduos jovens apresentariam maior índice de fixação do que os indivíduos adultos e que, portanto, haveria seleção contra homozigotos entre esses estádios de desenvolvimento. Este resultado difere também do encontrado em diversas espécies arbóreas tropicais com elevadas taxas de cruzamento como, por exemplo, *Astrocaryum mexicanum* (EGUIARTE et al., 1992), *Cavallinesia platanifolia* (MURAWSKI et al., 1990), *Cecropia obtusifolia* (ALVAREZ-BUYLLA et al., 1996), *Cedrela fissilis* (GANDARA, 1996), *Ceiba pentandra* (MURAWSKI e HAMRICK, 1992), *Psychotria faxlucens* (PÉREZ-NASSER et al., 1993), *Shorea megistophylla* MURAWSKI et al. (1994) e *Stemonoporus oblongifolius* MURAWSKI e BAWA, 1994) (Tabela 24 dos ANEXOS). Para as espécies acima citadas a progênie apresentou um índice de fixação maior do que os adultos analisados.

Alguns autores, entretanto, encontraram um maior índice de fixação nos indivíduos adultos do que na progênie (Tabela 24 dos ANEXOS). LEPSCH-CUNHA (1996), por exemplo, estudando uma espécie arbórea na Amazônia, polinizada por abelhas grandes e dispersada pelo vento, *Couratari guianensis*, encontrou um maior índice de fixação na a população adulta ( $\hat{F} = 0,518$ ) do que nos indivíduos jovens ( $\hat{F} = 0,377$ ). A autora citada sugere que este resultado reflete que esta população mais jovem pode ter se originado de maior fluxo gênico do que a população de adultos. Para LEPSCH-CUNHA (1996), esse resultado seria explicado pelo efeito “gargalo de garrafa” e posterior aumento populacional (NEI, 1975), concomitante com o modelo de migrante (SLATKIN, 1977). LEPSCH-CUNHA (1996), citando ELLSTRAND e ELLAM (1993), CHARLESWORTH e CHARLESWORTH (1987) e ALVAREZ-BUYLLA e GARAY (1994). LEPSCH-CUNHA (1996) propõe a hipótese de que a presença de excesso de homozigotos nos adultos seria resultante de um processo de deriva ocorrido no passado por redução populacional ou colonização da área por poucos indivíduos (efeito fundador). A eliminação dos homozigotos com o tempo poderia ter ocorrido através da depressão endogâmica, gerando um aumento da heterozigosidade no tempo, refletida nos jovens. A autora sugere ainda que este aumento da heterozigosidade também possa estar se originando no aumento populacional, aliado ao fluxo gênico intenso a longa distâncias, via pólen e sementes. Apesar de não ter sido verificada endogamia significativa nas populações de *A. polyneuron*, esta hipótese pode ser sugerida para explicar também o maior índice de fixação encontrado nos adultos do que nos indivíduos jovens de *A. polyneuron* analisados no presente trabalho. O aumento da heterozigosidade nos jovens pode ter sido gerado pelo amplo fluxo gênico entre populações mais endogâmicas.

Uma outra hipótese que, não sendo excludente em relação à anterior, poderia contribuir para o resultado encontrado seria consequência da poliembrião que ocorre de forma generalizada em *A. polyneuron*, conforme abordado no Capítulo I. Esta hipótese se baseia nos pressupostos de que: (i) alguns dos embriões formados seriam de origem apenas materna e, portanto, com genótipo independente do evento de cruzamento ocorrido, (ii) a seleção favoreceria os genótipos mais heterozigotos na fase de estabelecimento das plântulas e (iii) na floresta, apenas uma plântula a partir de cada semente dispersada consegue se estabelecer com sucesso (observação pessoal). Assim, haveria seleção dos genótipos heterozigotos, independentemente do sistema de cruzamento. Isto aumentaria a heterozigosidade observada em relação à esperada, já que embriões com genótipos maternos favorecidos pela seleção (mais heterozigotos) teriam maior chance de sucesso em detrimento dos

embriões com genótipos mais homocigotos originados sexualmente através de cruzamento ou, eventualmente, autofecundação.

Em outras palavras, a poliembrião, em conjunto com a apomixia, poderia constituir uma estratégia para manutenção de genótipos idênticos aos da planta mãe, independentemente do tipo do cruzamento ocorrido (autofecundação ou cruzamento). Esta pode constituir, também, uma das estratégias para manutenção de uma elevada diversidade genética dentro das populações, constituindo um efeito tampão contra eventos de deriva genética, conseqüente da diminuição populacional repentina.

Por outro lado, a grande variação na taxa de germinação de sementes de *A. polyneuron* citada na literatura sugere a possibilidade da ocorrência de eventos tais como a seleção natural anteriores ao estágio de plântula, que podem estar atuando na alteração das frequências alélicas esperadas.

A associação entre as estimativas obtidas para os indivíduos jovens e aquelas obtidas para os indivíduos adultos só pode ser interpretada tendo-se como objetivo compreender a origem da amostra de indivíduos jovens a partir da população de indivíduos adultos. O contrário, ou seja, supor que a estrutura genética das populações atuais de adultos quando jovens era similar à amostragem de jovens atual, deve ser feito com cautela. Os eventos que deram origem às atuais populações de adultos são remotos e anteriores ao processo de desmatamento do entorno e isolamento da Estação Ecológica dos Caetetus. Estes eventos, tais como tamanho populacional, densidade e distribuição espacial dos indivíduos, fluxo gênico e migração, eventos de deriva ou seleção natural, podem, portanto, ter sido diferentes dos que deram origem à atual regeneração.

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi concordante com a maior parte dos trabalhos realizados com espécies arbóreas tropicais (Tabela 23 dos ANEXOS), ou seja, a maior parte desta variabilidade encontra-se dentro das populações, havendo pouca divergência entre elas, o que pode ser verificado pelas estimativas obtidas para  $F_{ST}$  (0,061),  $G_{ST}$  (0,060) e identidade de NEI (1978) (0,962). A semelhança entre  $\hat{F}_{ST}$  e  $\hat{G}_{ST}$  indica que a amostragem foi suficientemente ampla para evitar vieses ligados ao tamanho da amostra conforme discutido por COCKERHAM e WEIR (1983). O fluxo gênico encontrado, entretanto, de 0,98 indivíduos por geração, foi pequeno (< 1,0) indicando uma tendência de diferenciação entre as populações estudadas. O valor encontrado para  $N_m$  foi inferior ao estimado para muitas espécies arbóreas tropicais já estudadas (Tabela 23 dos

ANEXOS), entretanto, tal comparação deve ser feita com cautela devido à diferença nas metodologias utilizadas no cálculo de Nm.

A taxa de cruzamento aparente foi elevada (0,82 e 0,90 para as Populações 1 e 2, respectivamente), provavelmente indicando que esta espécie é, preferencialmente alógama. Este resultado reforça a hipótese de SHEPHERD (comunicação pessoal) de haver algum sistema de autoincompatibilidade em *A. polyneuron*. Ademais, esta taxa elevada de cruzamento concorda plenamente com as elevadas heterozigosidades encontradas nas populações estudadas, assim como na amostra de indivíduos jovens.

## 7. CONCLUSÕES

1) A heterozigosidade encontrada em *A. polyneuron* ( $\hat{H}_T = 0,257$ ) pode ser considerada elevada, comparada à encontrada em outras espécies arbóreas tropicais já estudadas. Da mesma forma, dentro das populações analisadas a diversidade genética foi elevada ( $\hat{H}_e = 0,243$  e  $0,270$ ), respectivamente, distribuída, principalmente, dentro das populações ( $\hat{F}_{ST} = 0,061$ ,  $\hat{G}_{ST} = 0,060$  e identidade de NEI (1978) =  $0,962$ ). A taxa de fluxo gênico encontrada indica uma tendência à diferenciação entre as populações estudadas. A heterogeneidade encontrada para as estimativas de F para os locos individuais indica a necessidade do aumento da amostragem genética (número de locos analisados) para inferências mais seguras sobre os processos evolutivos que estão agindo sobre as populações de *A. polyneuron*.

2) Foi encontrado maior índice de fixação nos adultos ( $\hat{F} = 0,025$  e  $-0,130$ , para as Populações 1 e 2, respectivamente) do que na amostra de indivíduos jovens ( $\hat{F} = -0,326$ ), indicando que o sistema reprodutivo por si só não explica as estimativas encontradas nesta última categoria.

3) A poliembrionia, em conjunto com a apomixia devem constituir estratégias importantes, que podem estar influenciando sobre a estrutura genética e demográfica em populações de *A. polyneuron*, o que deve ser investigado.

4) A alta diversidade genética nas populações de indivíduos adultos, em conjunto com as características atuais de estrutura das populações, ou seja, densidade, distribuição espacial e distribuição de tamanho, mesmo na presença de um padrão supra-anual de reprodução, são capazes de gerar uma regeneração intensa e com elevada diversidade genética.

# CAPÍTULO III: ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DENTRO DE DUAS POPULAÇÕES DE *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg . (PEROBA ROSA)

## 1. INTRODUÇÃO

Assim como a maioria das espécies de árvores da floresta tropical estudadas até o momento (Tabela 22 dos ANEXOS), *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) apresentou a maior parte da sua diversidade genética ocorrendo dentro das populações, conforme apresentado no Capítulo II. Este padrão de distribuição da diversidade genética gera a pergunta de como se dá a sua organização ao nível intrapopulacional.

O principal objetivo desse Capítulo foi, portanto, caracterizar a distribuição espacial dos genótipos dentro das duas populações de *Aspidosperma polyneuron* analisadas, assim como dentro da parcela amostral de indivíduos jovens, visando identificar a presença de algum padrão não aleatório de distribuição espacial destes genótipos, tais como a agregação de genótipos semelhantes, ou seja, indivíduos adultos aparentados. Uma das principais consequências da agregação de genótipos semelhantes é o desvio da panmixia, através do aumento da probabilidade de cruzamento entre indivíduos aparentados, que pode gerar um aumento da endogamia a nível intrapopulacional.

### Hipótese:

i) Considerando que (i) não há heterogeneidade ambiental significativa dentro das áreas onde foram amostradas as Populações 1 e 2; (ii) que *A. polyneuron* deve ter como polinizador(es) provável(eis) pequenos insetos capazes de voar a distâncias maiores do que entre árvores vizinhas, e tem dispersão anemocórica realizada na seca, quando a semidecuidade da floresta permite que as sementes alcancem longas distâncias e (iii) a amostra de indivíduos jovens apresentou um desvio do EHW no sentido de um excesso de heterozigotos (Capítulo II); tem-se a hipótese de que os genótipos tanto de indivíduos adultos quanto dos indivíduos jovens, estão distribuídos aleatoriamente no espaço, dentro de populações de *A. polyneuron*.

## 2. OBJETIVOS

- a) Analisar a distribuição espacial dos genótipos dos indivíduos adultos de duas populações naturais de *A. polyneuron* amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP.
- b) Analisar a distribuição espacial dos genótipos de uma amostra de indivíduos jovens coletada a partir de uma população de *A. polyneuron* na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP.

## 3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

Diversos fatores são responsáveis pelo padrão de distribuição espacial da variabilidade genética dentro de populações de plantas, sendo os principais:

- i) A seleção natural em função da heterogeneidade ambiental (BRADSHAW, 1984). Segundo HAMRICK (1983) a adaptação a microhabitats específicos pode se dever a fatores abióticos ou bióticos;
- ii) o modo de reprodução: vegetativo ou via sexual (HAMRICK, 1983);
- iii) o sistema reprodutivo (MURAWSKI et al., 1994);
- iv) a ocorrência de cruzamentos preferenciais ou não entre indivíduos mais próximos, determinada pela distância de fluxo gênico via pólen (EPPERSON e ALLARD, 1989), e
- v) a distância de dispersão de sementes (EPPERSON e ALLARD, 1989).

Assim, o fluxo gênico limitado e seleção a microambientes tendem a gerar agregação de alelos, enquanto que seleção independente do local e migração reduzem a agregação de alelos (EPPERSON, 1990).

Para se poder afirmar com segurança que a estrutura espacial encontrada se deve ao efeito da seleção microambiental, diversas gerações devem ser estudadas (TOKUNAGA e OHNISHI, 1992). Quando o padrão não continua o mesmo nas gerações seguintes, a hipótese de seleção para microhabitats específicos como causadora da agregação de alelos pode ser descartada, conforme feito

por TOKUNAGA e OHNISHI (1992), estudando populações naturais de rabanete selvagem no Japão (*Raphanus sativus* L.) em duas gerações sucessivas.

Esses autores argumentam que a agregação encontrada para *Raphanus sativus* deve ter como explicação o fluxo gênico que, para esta espécie, é de curta distância tanto via sementes quanto via pólen, além do pequeno  $N_e$  e alogamia completa. TOKUNAGA e OHNISHI (1992) sugerem também que diferenças nas taxas de fertilidade possam causar o mesmo efeito, devido à maior contribuição dos alelos de determinados indivíduos em relação aos demais.

HAMRICK (1983) cita diversos trabalhos que demonstram ser comum uma distribuição não aleatória de alelos e genótipos dentro de populações naturais de plantas. Por outro lado, em algumas populações naturais de espécies arbustivo-arbóreas tropicais já estudadas, tal padrão não tem sido encontrado tais como em *Psycotria nervosa* (DEWEY e HEYWOOD, 1988) e *Cedrela fissilis* (GANDARA, 1996).

## 4. METODOLOGIA

As populações de *A. polyneuron* analisadas estão descritas no Capítulo I.

Para a análise da estrutura genética espacial dentro dessas populações, foi utilizada a estimativa do Índice de Moran (I), apresentada por SOKAL e ODEN (1978a e 1978b). Este coeficiente é o mais comumente empregado em análises de autocorrelação espacial de espécies de plantas e quantifica a similaridade genética de pares de indivíduos adjacentes em relação à amostra da população como um todo. Através deste índice pode-se avaliar a dependência entre alelos de cada ponto geográfico com alelo de outros pontos, utilizando-se os genótipos individuais dos locos polimórficos. O índice de Moran é obtido através de:

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

sendo:

$n$  - número de indivíduos utilizados na análise,

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

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

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

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

Assim, para cada indivíduo, em cada loco estudado, a presença de um alelo específico em homozigose determinou o valor 1, em heterozigose o valor 0,5 e a ausência do alelo determinou o valor 0. Este índice pode assumir valores entre +1 (autocorrelação positiva completa - pares idênticos) e -1 (autocorrelação negativa completa - pares completamente diferentes). O cálculo dos valores do índice de Moran (I) foi feito através do uso do programa AUTOCORR, desenvolvido por HEYWOOD.

Na hipótese nula de disposição espacial completamente aleatória,  $I(k)$  tem um valor esperado próximo a 0 (equivalente a  $\mu$ ), conforme explicado por TOKUNAGA e OHNISHI (1992).

$$\mu = -1/(n-1) \text{ para todo } k$$

onde  $k$  corresponde às classes

O programa AUTOCORR fornece um teste estatístico para desvios de  $I(k)$  em relação a esse valor, baseado na aproximação amostral gaussiana. Através do teste  $z$  foi avaliada a significância desse desvio - DP (CLIFF e ORD, 1981), da seguinte forma:

$$z = \{I(k) - \mu\} / DP$$

Neste teste o valor de  $z$  encontrado é considerado significativo ao nível de 5% e 1% para  $z \geq 1,98$  e  $z \geq 2,56$  respectivamente (TOKUNAGA e OHNISHI, 1992).

O cálculo do índice  $I$  se baseia nas comparações de pares de pontos mapeados que contenham a variável em estudo, utilizando um peso para cada comparação de acordo com o padrão investigado. O programa AUTOCORR permite somente ponderação binária, ou seja, pares de pontos assumem peso 0 ou 1. Quando o peso for 0, a associação não é considerada na análise, e todos os pares que assumem

peso 1 são ponderados igualmente na análise. Através da ponderação pode-se testar hipótese específicas de estruturação espacial em contraposição à hipótese nula de ausência de estrutura espacial.

Neste trabalho utilizou-se três métodos que estabelecem os critérios para ponderação, ou seja, a escolha dos pares que serão considerados na análise (e que receberão peso 1). São eles: **conexão de Gabriel**, comparações de **vizinho mais próximo** e todas as comparações dentro de **classes de distâncias** especificadas.

No primeiro método, o da conexão de Gabriel, dois indivíduos A e B são pareados quando nenhum indivíduo ocorrer dentro do círculo de diâmetro igual ao segmento de reta AB (SOKAL e ODEN, 1978). Este método tem como vantagem a geração de uma grande número de pares de indivíduos para o cálculo de I (Tabelas 17, 18 e 19).

No método do vizinho mais próximo, assumem peso 1 os pares adjacentes, sendo que todos os demais pares assumem peso 0 ((SOKAL e ODEN, 1978). A principal vantagem deste método com relação ao anterior é a geração de distâncias médias menor entre plantas (Tabelas 17, 18 e 19).

Utilizando-se classes de distâncias especificadas, todas as comparações entre pares de indivíduos cuja distância se encontra dentro de determinada classe assumem peso 1 e as demais comparações assumem peso 0. Através deste método pode-se construir um gráfico denominado CORRELOGRAMA, que mostra os valores de I para cada classe de distância. Neste estudo, em todas as classes de distâncias especificadas foram feitas pelo menos 30 comparações.

Foram analisados 4 alelos para os indivíduos jovens e 7 alelos para os indivíduos adultos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Indivíduos Jovens

Os resultados obtidos para I utilizando-se os métodos da conexão de Gabriel e do vizinho mais próximo, assim como os desvios padrão encontrados estão na Tabela 17 a seguir. Nesta amostra foram analisados 4 alelos.

*Tabela 17: Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) analisando-se 4 alelos em uma amostra de indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, a partir dos métodos: conexão de Gabriel e vizinho mais próximo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	<u>conexão de Gabriel</u>		<u>vizinho mais próximo</u>	
	I	DP	I	DP
Lap - alelo1	0,097 <sup>ns</sup>	0,0520	0,198*	0,0799
Pgi - alelo 2	0,020 <sup>ns</sup>	0,0522	0,068 <sup>ns</sup>	0,0792
Pgi - alelo 3	-0,029 <sup>ns</sup>	0,0522	0,113 <sup>ns</sup>	0,0792
Pgm - alelo 1	0,099 <sup>ns</sup>	0,0546	0,032 <sup>ns</sup>	0,0823
distância média (m)	1,08		0,57	
número médio de comparações	353		157	

I - índice I de Moran

DP - desvio padrão

ns - não significativo

\* P <0,05

O índice I de Moran assumiu um valor significativo (5%) para somente um alelo através do método do vizinho mais próximo, não constituindo evidência de formação de estruturação genética espacial nesta amostra, através dos marcadores utilizados.

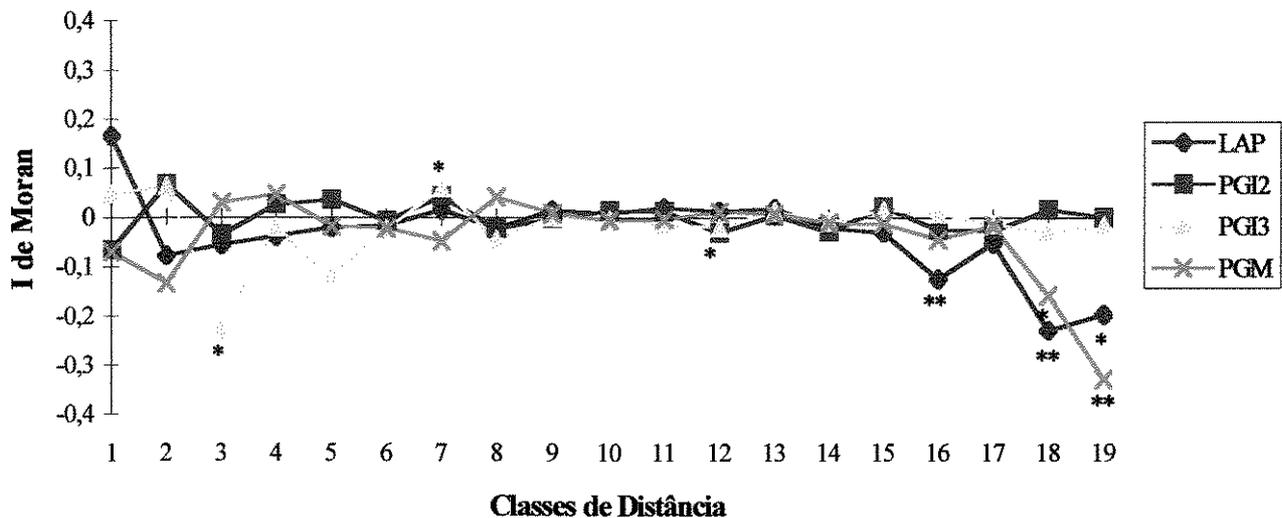
Para a amostra de indivíduos jovens foram estabelecidas 19 classes de distância para a análise do índice de Moran (Tabela 18) e construção dos correlogramas de cada alelo analisado. Na Figura 9, a seguir, encontra-se o correlograma dos 4 alelos analisados, enquanto que a Figura 10 apresenta o

correlograma obtido para a média dos valores de I de Moran em cada classe de distância. Os correlogramas dos locos individuais encontram-se nos ANEXOS (item 5).

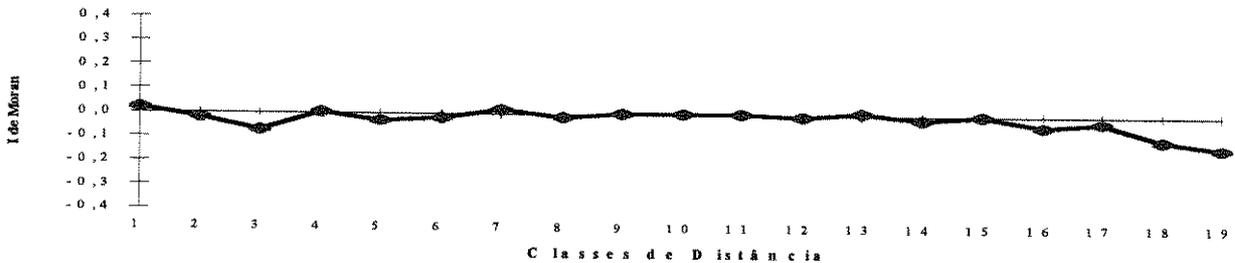
**Tabela 18:** Intervalos de distância utilizados na construção dos correlogramas de indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

Classe	Intervalo de Distância (m)	Classe	Intervalo de Distância (m)
1	0,0 - 0,2	11	8,0 - 10,0
2	0,2 - 0,4	12	10,0 - 15,0
3	0,4 - 0,6	13	15,0 - 20,0
4	0,6 - 0,8	14	20,0 - 25,0
5	0,8 - 1,0	15	25,0 - 30,0
6	1,0 - 2,0	16	30,0 - 35,0
7	2,0 - 3,0	17	35,0 - 40,0
8	3,0 - 4,0	18	40,0 - 45,0
9	4,0 - 6,0	19	45,0 - 50,0
10	6,0 - 8,0		

**Figura 11:** Correlograma dos 4 alelos analisados em uma amostra de indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.



**Figura 12:** Correlograma da média dos valores de I dos 4 alelos analisados em uma amostra de indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.



Pode-se observar pela Figura 11 que, de forma geral, os valores encontrados estiveram próximos ao eixo x, oscilando entre valores positivos e negativos, ou seja, os genótipos estiveram distribuídos aleatoriamente no espaço, apesar de alguns valores negativos significativos terem sido encontrados nas classes de maior distância, para dois dos alelos analisados. A Figura 12 com os I's médios dos 4 alelos evidencia a aleatoriedade dos genótipos no espaço.

## 5.2 Adultos

### 5.2.1 População 1

A Tabela 19, a seguir, mostra os resultados de I encontrados através do uso dos métodos da conexão de Gabriel e do vizinho mais próximo para a População 1. Ambas as populações de adultos (1 e 2), tiveram sete alelos analisados.

Para apenas um alelo o resultado do teste z que detecta a significância de I foi significativo pelo método da conexão de Gabriel, enquanto que, usando o método do vizinho mais próximo, 2 alelos foram significativamente semelhantes para os indivíduos pareados, sendo os dois ao nível de 5% de significância.

*Tabela 19: Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) analisando-se 7 alelos da População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, a partir dos métodos: conexão de Gabriel e vizinho mais próximo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	<u>conexão de Gabriel</u>		<u>vizinho mais próximo</u>	
	I	DP	I	DP
Pgi - alelo 2	0,170 <sup>ns</sup>	0,1038	0,228 <sup>ns</sup>	0,1536
Pgi - alelo 3	0,285**	0,1038	0,362*	0,1536
Lap - alelo 2	0,088 <sup>ns</sup>	0,1055	0,129 <sup>ns</sup>	0,1554
Lap - alelo 3	0,095 <sup>ns</sup>	0,1055	0,187 <sup>ns</sup>	0,1554
6Pgdh1 - alelo 2	0,166 <sup>ns</sup>	0,1038	0,220 <sup>ns</sup>	0,1536
6Pgdh1 - alelo 3	0,028 <sup>ns</sup>	0,1043	0,087 <sup>ns</sup>	0,1554
6Pgdh2 - alelo 2	0,110 <sup>ns</sup>	0,1043	0,376*	0,1554
distância média (m)	25,35		13,91	
número médio de comparações	88		41,5	

I - índice I de Moran

DP - desvio padrão

ns - não significativo

\* P < 0,05

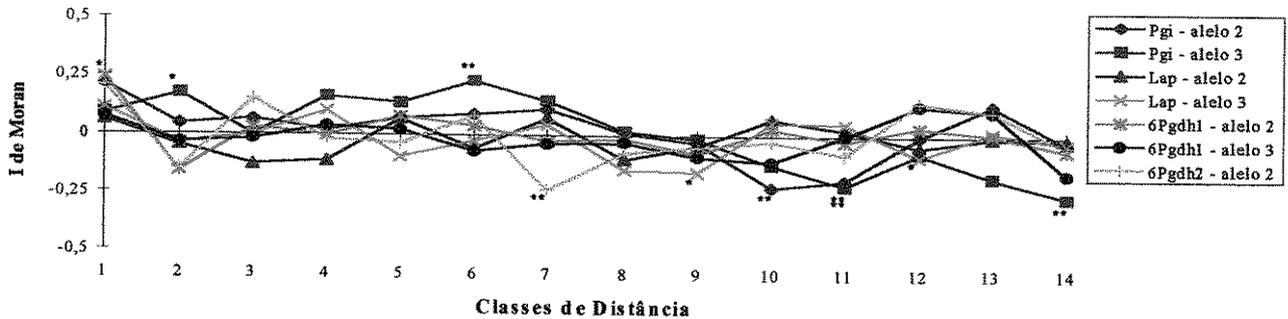
\*\* P < 0,01

Foram estabelecidas 14 classes de distâncias (Tabela 20), que foram utilizadas na construção dos correlogramas das Populações 1 e 2. A Figura 13 mostra o correlograma conjunto de todos os alelos analisados na População 1, usando-se as estimativas de I dos sete alelos analisados, enquanto que a Figura 14 mostra o correlograma obtido para a média destes sete alelos nas diversas classes de distância.

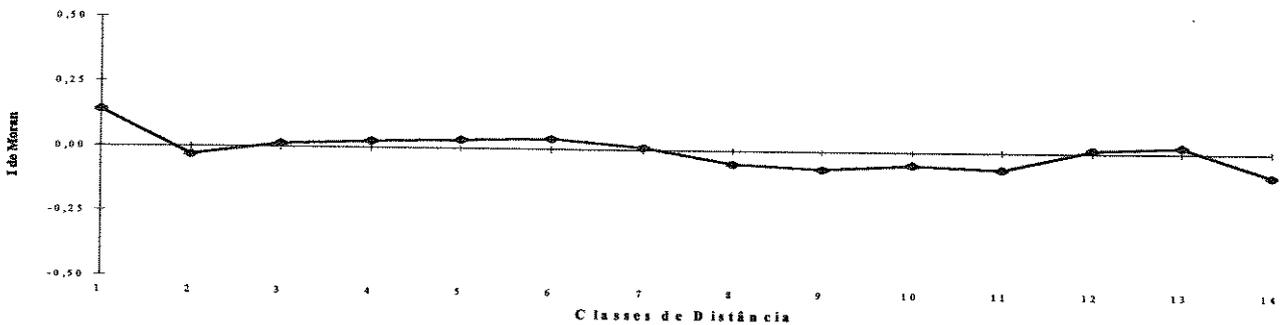
*Tabela 20: Intervalos de distância utilizados na construção dos correlogramas das Populações 1 e 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Classe	Intervalo de Distância (m)	Classe	Intervalo de Distância (m)
1	0-20	8	140-160
2	20-40	9	160-180
3	40-60	10	180-200
4	60-80	11	200-240
5	80-100	12	240-280
6	100-120	13	280-320
7	120-140	14	320-400

**Figura 13:** Correlograma dos 7 alelos analisados na População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.



**Figura 14:** Correlograma da média dos valores de I dos 7 alelos analisados na População 1 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.



Da mesma forma que para a amostra de indivíduos jovens, os correlogramas dos locos individuais encontram-se nos ANEXOS (item 6).

Ao serem pareados indivíduos de diferentes classes de distância, alguns alelos (Pgi - alelos 2 e 3; Lap - alelo 3 e 6Pgdh-2 - alelo 2) apresentaram significância para valores negativos de I nas classes de maior distância (a partir de 120 m). Até a classe 6 (120 m), alguns poucos alelos apresentaram uma tendência de I positivos, mas a significância foi pequena (5%). Dos 76 dados analisados na amostra de indivíduos jovens, apenas 8 apresentaram-se significativos, sendo que para a maioria (5) a significância foi de 5% (Tabela 25 dos ANEXOS).

Entretanto, ao se considerar a média dos valores de I considerando-se os sete alelos analisados, nenhum padrão significativo pôde ser detectado, indicando aleatoriedade na distribuição espacial destes alelos na população 1.

### 5.2.2 População 2

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos para as estimativas de I usando-se os métodos da conexão de Gabriel e do vizinho mais próximo.

Na sequência, encontra-se a Figura 15 mostrando o correlograma construído através da estimativa de I usando-se as mesmas classes de distância utilizadas para a População 1 (Tabela 20). A Figura 14 seguinte mostra o correlograma obtido para a média dos I's dos sete alelos analisados.

*Tabela 21: Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) analisando-se 4 alelos em uma amostra de indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP, a partir dos métodos: conexão de Gabriel e vizinho mais próximo. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.*

Loco	<u>conexão de Gabriel</u>		<u>vizinho mais próximo</u>	
	I	DP	I	DP
PGI - alelo 1	0,112 <sup>ns</sup>	0,1066	0,072 <sup>ns</sup>	0,1678
PGI - alelo 3	-0,043 <sup>ns</sup>	0,1066	0,002 <sup>ns</sup>	0,1678
LAP - alelo 2	-0,082 <sup>ns</sup>	0,1094	-0,025 <sup>ns</sup>	0,1702
LAP - alelo 3	-0,081 <sup>ns</sup>	0,1094	-0,035 <sup>ns</sup>	0,1702
6Pgdh1 - alelo 2	0,169 <sup>ns</sup>	0,1055	0,173 <sup>ns</sup>	0,1655
6Pgdh1 - alelo 3	0,197 <sup>ns</sup>	0,1060	0,297 <sup>ns</sup>	0,1679
6Pgdh2 - alelo 2	0,109 <sup>ns</sup>	0,1060	0,179 <sup>ns</sup>	0,1679
distância média (m)	35,20		20,08	
número médio de comparações	82,75		35	

I - índice I de Moran

DP - desvio padrão

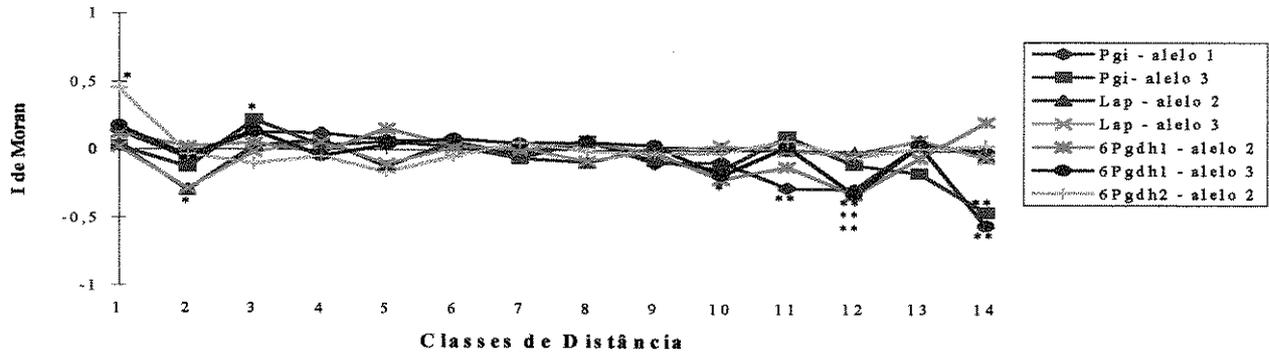
ns - não significativo

\* P < 0,05

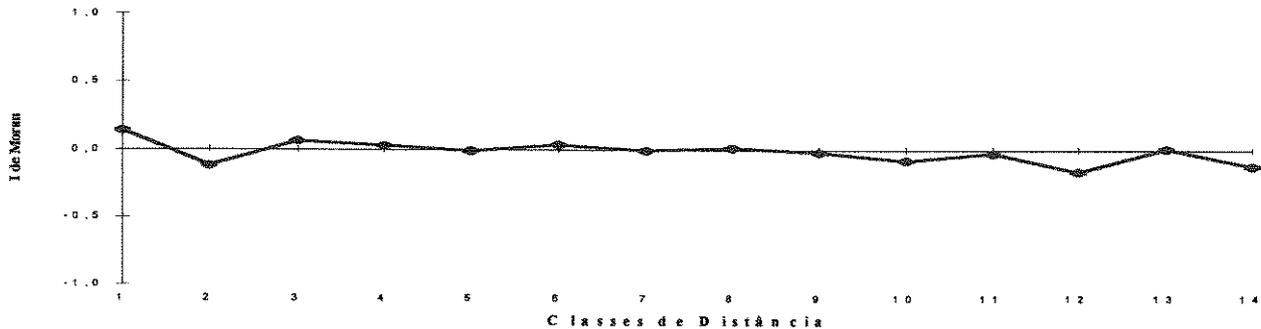
\*\* P < 0,01

Utilizando-se os métodos de pareamento conexão de Gabriel e do vizinho mais próximo, nenhum resultado significativo estatisticamente foi encontrado. Através destes métodos não foi possível, portanto, encontrar nenhum indicativo de estruturação genética espacial nestas populações.

**Figura 15:** Correlograma dos 7 alelos analisados na População 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.



**Figura 16:** Correlograma da média dos valores de I dos 7 alelos analisados na População 2 de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.



Ao se construir o correlograma analisando as estimativas de I para as diversas classes de distância, foi possível detectar uma leve tendência de pares de indivíduos mais distantes entre si (240 e 400 m de distância) apresentarem uma valor de I negativo significativo (alelos 1 e 3 da Pgi, alelo 2 da 6Pgdh-2 e alelo 2 da 6Pgdh-1), ou seja, indivíduos com alelos mais diferentes entre si.

Nas classes de menor distância, 3 valores foram significativos a 5%, entretanto 2 valores sendo positivos e 1 negativo, evidenciando a aleatoriedade na distribuição dos genótipos nessas classes de distância.

## 6. DISCUSSÃO

Para os indivíduos jovens, não houve evidência de agrupamento de genótipos semelhantes, pelos métodos da conexão de Gabriel e do vizinho mais próximo. Entretanto, a partir do correlograma, alguns valores foram significativos a partir de 30 m de distância. Por outro lado, considerando-se o I médio para os quatro alelos analisados, não foi encontrado nenhum valor significativo em qualquer classe de distância.

A distância aproximada entre indivíduos adultos é de entre 15 e 35 m (Tabelas 19 e 21), correspondendo às classes 11 a 14 do correlograma de indivíduos jovens. A tendência para que os indivíduos jovens sejam genotipicamente diferentes entre si nestas classes de distância, onde deve ser maior o sucesso no estabelecimento, concorda com a distribuição espacial aleatória encontrada para os genótipos dos indivíduos adultos próximos entre si (entre 15 e 35 m).

Para as duas populações de indivíduos adultos, houve concordância entre as estimativas do índice I de Moran obtidos via conexão de Gabriel e método do vizinho mais próximo com aqueles obtidos nas diversas classes de distância. De fato, os dois primeiros métodos têm por objetivo estimar a semelhança entre os genótipos de indivíduos que se encontram próximos uns dos outros. Através de nenhum dos três métodos utilizados foi detectada essa semelhança, indicando não haver agregação de indivíduos aparentados. Na População 2, a oscilação entre valores positivos e negativos nas primeiras classes de distâncias e valores não significativos para as médias de I reforçam essa conclusão.

Somente o método das classes de distância faz comparações entre indivíduos distantes entre si. Através desse método foi detectada uma tendência de os indivíduos mais distantes (a partir de 120 m para a População 1 e a partir de 250 m para a População 2) serem diferentes para os alelos analisados.

Em para ambas as populações de adultos, dos 98 dados analisados apenas 10 foram significativos a 1 ou 5 % (Tabelas 26 e 27 dos ANEXOS), nas diferentes classes de distância, evidenciando um padrão aleatório de distribuição dos genótipos nas áreas estudadas.

Os resultados obtidos para as duas populações de indivíduos adultos são semelhantes aos obtidos por GANDARA (1996), que estudou a distribuição de genótipos em uma população natural de *Cedrela fissilis*, espécie rara e longeva da floresta atlântica (Brasil) e por DEWEY e HEYWOOD (1988) que testaram a presença de estrutura genética espacial em uma população de *Psycotria nervosa*,

uma espécie de arbusto comum no subdossel de florestas do sul da Flórida (EUA). Em ambos os casos não foi detectada estruturação espacial dos genótipos dentro das populações estudadas, sugerindo que o fluxo gênico, nestes casos, é suficientemente amplo para prevenir a formação de estrutura a partir da deriva genética e/ou seleção local.

Vários fatores devem estar atuando na formação do padrão aleatório encontrado para a distribuição dos genótipos de *A. polyneuron*. Além do fluxo gênico a longa distância tanto via polinização quanto via dispersão de sementes e da ausência de seleção para microhabitats específicos, a sobreposição de gerações deve ter um papel relevante na ausência de agregação alélica. Conforme discutido no Capítulo II, a presença de indivíduos reprodutivos de tamanhos discrepantes indica a possibilidade de haver cruzamento entre indivíduos oriundos de eventos reprodutivos passados completamente diversos. Por exemplo, a densidade e distribuição espacial dos indivíduos adultos podem ter flutuado ao longo do tempo, o que implicaria em diferentes graus de aleatoriedade dos cruzamentos; climas diversos podem ter ocorrido, o que influenciaria a produção de flores, a polinização e/ou a dispersão de sementes.

## 7. CONCLUSÕES

1) Os genótipos dos indivíduos jovens estão distribuídos aleatoriamente no espaço na área amostrada. A diferença genotípica encontrada entre os indivíduos situados nas classes de distâncias onde ocorre o estabelecimento das árvores é coerente com o padrão de distribuição aleatório encontrado nas duas populações de indivíduos adultos.

2) Em nenhuma das duas populações de indivíduos adultos há agregação de indivíduos semelhantes genotipicamente (aparentados), indicando que o fluxo gênico via semente deve ser suficientemente amplo para prevenir a formação destes agregados. Além disso, esta distribuição dos genótipos indica que os cruzamentos devem ocorrer entre indivíduos não aparentados. Este resultado é coerente com aqueles encontrados para os coeficientes de endogamia médios não significativos (Capítulo II) nestas duas populações.

# CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 1. ESTRUTURA GENÉTICA

Os resultados encontrados neste estudo mostram que as duas populações da espécie *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa), amostradas na Estação Ecológica dos Caetetus, apresentam alta diversidade genética ( $\hat{H}_e$  respectivos 0,237 e 0,239), situando-se acima da média encontrada para outras espécies arbóreas tropicais já estudadas. Da mesma forma que para a maioria destas espécies, essa diversidade encontra-se principalmente dentro das populações, havendo pouca diferenciação genética entre elas, detectável através dos marcadores utilizados neste trabalho ( $\hat{F}_{ST} = 0,061$ ,  $\hat{G}_{ST} = 0,060$  e identidade de NEI (1978) = 0,962).

A heterogeneidade encontrada entre os índices de fixação nos diversos locos estudados nas populações de indivíduos adultos evidencia a necessidade de se aumentar a amostragem de locos para a caracterização mais precisa das forças evolutivas que estão atuando sobre estas populações.

A diversidade genética estimada para a amostra de indivíduos jovens foi semelhante à estimada para os indivíduos adultos, sendo que na primeira categoria foi encontrado um excesso significativo de heterozigotos, com relação ao esperado em populações panmíticas. A média dos locos analisados ( $\hat{F} = -0,326$ ) evidencia que o sistema reprodutivo por si só não explica o padrão de estrutura genética encontrado nesta categoria. Duas hipóteses não excludentes foram sugeridas para explicar o padrão encontrado. A análise da diversidade e dos níveis de fixação em estágio do ciclo vital anterior ao analisado neste estudo pode ajudar a elucidar esta questão.

Alguns mecanismos que podem estar envolvidos na geração da elevada diversidade encontrada, principalmente na amostra de indivíduos jovens são: alogamia favorecida por mecanismos eficientes de autoincompatibilidade, amplo fluxo gênico, migração, eventos passados de deriva com posterior migração (metapopulação), ocorrência generalizada de poliembrionia e sobreposição de gerações.

As estimativas de heterozigosidade observada e esperada sugerem que esta espécie apresenta elevada taxa de cruzamento. De fato, a elevada taxa de cruzamento aparente encontrada (0,82 e 0,90 respectivamente para cada população estudada), mesmo levando-se em consideração o viés deste

estimador, sugere que *A. polyneuron* é uma espécie preferencialmente alógama, o que é coerente com os resultados de diversidade e índices de fixação encontrados nestas populações. A análise de progênies, o que não foi possível neste trabalho, permitiria a obtenção de uma estimativa de taxa de cruzamento com menores vieses, e permitiria também o estudo da movimentação dos alelos dentro e entre populações.

Dentro das populações, onde se encontra a maior parte da diversidade genética, o padrão de distribuição encontrado através da análise de autocorrelação espacial encontra-se muito próximo da aleatoriedade dos genótipos no espaço. Os marcadores usados não evidenciaram nenhum tipo de estrutura familiar, onde indivíduos parentes tendem a estar próximos uns dos outros aumentando a probabilidade de cruzamentos endogâmicos. Este padrão corresponde ao esperado, em função das características biológicas da espécie e concorda com os dados de diversidade genética encontrados.

Esses resultados evidenciam que a elevada diversidade genética encontrada nos indivíduos adultos, em conjunto com os atuais padrões de distribuição espacial (agregado para uma população e aleatório para a outra) e densidade dos indivíduos (aproximadamente 7 ind./ha), mesmo na presença de reprodução supra-anual, são capazes de originar uma intensa regeneração natural com alta diversidade genética distribuída aleatoriamente no espaço.

## 2. CONSERVAÇÃO E MANEJO

As sementes de *A. polyneuron* são de baixa longevidade, não apresentando dormência. Estas características representam limitações à conservação desta espécie, sob forma de semente, em bancos de germoplasma por longo período. Duas estratégias alternativas podem ser utilizadas para a conservação do germoplasma desta espécie: conservação *in situ* e conservação *ex situ in vivo*.

No que se refere à conservação *in situ*, as estimativas encontradas para os parâmetros de diversidade genética, utilizando marcadores alozímicos, indicam que áreas como a Estação Ecológica dos Caetetus são capazes de conservar uma elevada variabilidade genética dentro de populações de *A. polyneuron*. A estrutura populacional encontrada nas populações analisadas no presente estudo corrobora este indicativo pois, além de ter sido encontrada intensa regeneração, esta regeneração apresentou, na parcela amostrada, alta diversidade genética.

Conforme observado no presente trabalho, as populações de *A. polyneuron* estudadas não apresentaram coeficientes significativos de endogamia. Portanto, este não constitui um fator limitante para a sua conservação *in situ*.

No que se refere à conservação *ex situ*, a Estação Ecológica dos Caetetus é uma área adequada para coleta de ramos (enxertia), e sementes (produção de mudas), visando a implantação de áreas para conservação do germoplasma da espécie. Como a maior parte da diversidade genética foi encontrada dentro das populações de *A. polyneuron*, o esforço para coleta de sementes pode ser feito no sentido de se obter amostras de muitas árvores de uma única população, ao invés de despender esforço para coleta de árvores em diversos pontos da floresta. Através desta estratégia é muito provável que grande parte da variabilidade genética seja amostrada.

Plantios *ex situ* formados a partir de indivíduos amostrados adequadamente permitem não somente a conservação de germoplasma, mas também a produção de sementes visando a produção de mudas para plantios ou melhoramento. Devido às dificuldades de coleta de sementes na floresta, por causa da supra-anuidade na produção de sementes e produção de sementes em diversas épocas do ano, o plantio de “pomares para produção de sementes” otimizaria o trabalho e diminuiria os custos de produção de mudas desta espécie.

Apesar da baixa taxa de pegamento das enxertias de *A. polyneuron*, este constitui um método interessante para a propagação vegetativa desta espécie. Trabalhos devem ser realizados visando aumentar esta taxa de pegamento e otimização dos resultados.

A densidade de *A. polyneuron* pode atingir valores muito altos como o verificado por RODRIGUES (submetido), de 217 indivíduos/ha. É muito provável que isto ocorra devido a algum tipo de perturbação que permita a abertura de pequenas clareiras na floresta, pois *A. polyneuron* deve se beneficiar desse tipo de ambiente em seu desenvolvimento. Caso a diversidade genética permaneça elevada em tais populações, não havendo aumento de cruzamento entre parentes, nem formação de estrutura interna familiar, este pode ser um indicativo do potencial da espécie no sentido do seu manejo sustentado.

Os resultados encontrados no presente trabalho que corroboram o potencial para manejo sustentado de *A. polyneuron* são:

- (i) intensa regeneração natural;
- (ii) alta diversidade genética nos indivíduos jovens;
- (iii) ausência de estrutura genética espacial.

A definição de parâmetros para o manejo sustentado desta espécie deve levar em consideração a necessidade da manutenção de um número adequado de indivíduos reprodutivos por área, que permita a manutenção de padrões elevados de diversidade genética nas gerações futuras e previna efeitos de endogamia e deriva genética. A determinação desse número deverá levar em consideração a supra-anuidade da espécie e a assincronia no florescimento, que reduzem o número potencial de indivíduos que estarão se cruzando, fazendo com que o tamanho de vizinhança (número de indivíduos numa área de vizinhança ou área onde ocorre panmixia) seja maior do que o suposto a princípio pela densidade de adultos reprodutivos.

### 3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Conforme apresentado no decorrer deste trabalho, uma série de questões surgiram, indicando a necessidade do aprofundamento no estudo genético de populações naturais de *A. polyneuron*.

A análise de outras populações de indivíduos adultos a diferentes distâncias das populações analisadas no presente trabalho forneceria subsídios para a compreensão da dinâmica de movimentação dos alelos em diferentes níveis hierárquicos. Caso o padrão de distribuição da variabilidade genética seja semelhante ao encontrado no presente trabalho, confirmando que a maior parte da diversidade encontra-se localizada dentro das populações, grandes reservas para conservação *in situ* deverão ser privilegiadas, ao invés de várias pequenas reservas, e a coleta de germoplasma poderá ser representativa concentrando-se o esforço de coleta em poucas áreas.

Considerando o papel relevante da fragmentação das florestas estacionais semidecíduais do interior de São Paulo, o estudo de populações em fragmentos de diferentes tamanhos é fundamental para avaliar o impacto desse tipo de perturbação sobre a estrutura genética de *A. polyneuron*.

Outra questão importante se refere ao sistema reprodutivo da espécie, que, devido à elevada alogamia sugerida pelos dados de heterozigosidade e taxa de cruzamento aparente, deve envolver mecanismos eficientes de autoincompatibilidade, o que deve ser verificado. Este tipo de estratégia já foi verificado para várias espécies tropicais, inclusive para algumas espécies da família Apocynaceae (SHEPHERD, comunicação pessoal).

Através da análise de progênies de *A. polyneuron*, seria possível a determinação da taxa de cruzamento e o estudo do fluxo gênico entre populações e movimentação de alelos dentro de populações. Tais informações são fundamentais para o entendimento de quais os fatores envolvidos na formação do padrão de estrutura genética da espécie, com especial ênfase à diversidade encontrada na regeneração. Vários estádios de desenvolvimento da espécie também deveriam ser analisados para verificação das hipóteses sugeridas na discussão do Capítulo II para explicar o excesso de heterozigotos encontrado na amostra de indivíduos jovens.

A ausência de estrutura familiar, detectada através da autocorrelação espacial dos genótipos, a pequena diferenciação encontrada entre as duas populações estudadas, assim como o fluxo gênico

obtido (muito próximo de 1) sugerem que o fluxo gênico é efetivo a longa distância, o que pode ser investigado analisando-se as progênes.

A questão do papel da poliembrião na heterozigosidade encontrada na regeneração de *A. polyneuron*, conforme sugerido no Capítulo II, deve ser pesquisada. É necessário saber se há formação de embriões apomíticos, tanto para a compreensão do padrão de diversidade genética em populações naturais quanto para a diferenciação de tais embriões em programas de conservação de germoplasma ou melhoramento.

O papel da supra-anuidade da produção de sementes permanece obscuro. Tal fenômeno deveria, em tese, originar um padrão de cruzamento onde o tamanho efetivo populacional a cada evento reprodutivo é pequeno, gerando progênes com baixa diversidade genética. Entretanto, a ocorrência simultânea na mesma área de indivíduos oriundos de eventos reprodutivos diferentes (com parentais diferentes) geraria o padrão atual encontrado neste estudo, com alta variabilidade genética na população como um todo e especialmente nos indivíduos jovens. Esta é uma questão a ser investigada, o que pode ser feito através da análise genética de diversos eventos reprodutivos. Isto exigirá um trabalho minucioso de acompanhamento fenológico da população, para determinação dos parentais potenciais a cada evento reprodutivo. Através da determinação de quais são e que idade têm os parentais potenciais seria possível também analisar o papel da sobreposição de gerações sobre a estrutura genética da espécie e diversidade genética dos indivíduos jovens.

A definição de parâmetros seguros para o manejo sustentado de *A. polyneuron* exige, por sua vez, a análise de um número maior de populações em diferentes áreas para que se possa generalizar as recomendações, e o estudo de progênes com simulação de corte seletivo para avaliação do impacto do manejo sobre as gerações subsequentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242p.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; CHAOS, A.; PIÑERO, D.; GARAY, A.A. Demographic genetics of pioneer tropical tree species: path dynamics, seed dispersal, and seed banks. **Evolution**, v.50, n.3, p. 1155-1166. 1996.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; GARAY, A.A. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. **Evolution**, v.48, n.2, p. 437-453. 1994.
- ANDRADE LIMA, D. Vegetação. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA & CONSELHO NACIONAL DE GEOGRAFIA, (Ed.). **Atlas Nacional do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE/NG, 1966. Folha II-11.
- BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; SOBRINHO, J.T.; POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. **Bragantia**, v.50, n.1, p. 57-76. 1991.
- BARRET, S.C.H.; KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small populations size in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Ed.). **Genetic and conservation of rare plants**. N.Y.: Oxford University Press, 1991. p 3-30.
- BAWA, K.S. Breeding systems of trees species of a lowland tropical community. **Evolution** v.28, p. 85-92. 1974.
- BAWA, K.S.; PERR, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, v.72, p. 331-35. 1985.

- BEARDMORE, J.A. Extinction, survival and genetic variation. In: SCHOENWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park: Benjamin-Cummings, 1983. p. 125-151.
- BENNACER, M.; LANAUD, C.; CHEVALLIER, M.H.; BOUNAGA, N. Genetic diversity of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme markers. **Plant Breeding**, v.107, p. 56-69. 1991.
- BERNACCI, L.C. Estudo florístico e fitossociológico de uma floresta no Município de Campinas, com ênfase nos componentes herbáceos e arbustivos. Campinas-SP, 1992. 150p. Dissertação (Mestrado) - IB - UNICAMP.
- BRADSHAW, A.D. Ecological significance of genetic variation between populations. In: DIRZO, R.; SARUKHAN, J. (Ed.). **Perspective on plant population ecology**. Sunderland Mass: Sinauer, 1984. p. 213-228.
- BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.) **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part A, p. 219-239.
- BRUNE, A. Preservação das reservas genéticas de árvores nativas brasileiras. **Brasil Florestal**, v.6, n.24, p. 19-21. 1975.
- BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M.; APSIT, V.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. **Theoretical Applied Genetics**, v.76, p. 923-928. 1988.
- BUDOWSKI, G. Distribution of tropical american rain forest species in the light of succesional processes. **Turrialba** v.15, n.1, p. 40-42. 1965.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo-PR: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640p.
- CATHARINO, E.L.M. Estudos fisionômico-florístico e fitossociológico em matas residuais no município de Piracicaba, SP. Campinas-SP, 1989. 181p. Dissertação (Mestrado) - IB- UNICAMP.

- CAVASSAN, O.; CESAR, O.; MARTINS, F.R. Fitossociologia da vegetação arbórea da reserva estadual de Bauru, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.7, n.2, p. 91-106. 1984.
- CESAR, O.; LEITÃO FILHO, H.F. Estudo florístico quantitativo da mata mesófila semidecídua na fazenda Barreiro Rico, Município de Anhembi, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, v.50, n.1, p. 133-147. 1990.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p. 237-268. 1987.
- CHASE, M.R.; BOSHIER, D.; BAWA, K.S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. **American Journal of Botany**, v.82, n.4, p. 468-475. 1995.
- CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Long distance gene flow in fragmented tropical tree population. **Nature** (submetido).
- CHEVALLIER, M.H. Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germoplasm using isozyme markers. **Journal of Natural Rubber Research**, v.3, n.1, p. 42-53. 1988.
- CHIMELO, J.P.; MAINIERI, C.; NAHUZ, M.A.R.; PESSOA, A.L. Madeiras do Município de Aripuana, Estado de Mato Grosso. I - Caracterização anatômica e aplicações. **Acta Amazônica**, v.6, n.4 (Supl.), p. 95-106. 1976.
- CLARK, P.J.; EVANS, F.C. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. **Ecology**, v.35, n.4, p. 445-453. 1954.
- CLAYTON, J.; TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of Fisheries Reserch Board of Canada**, v.29, p. 1169-1172. 1972.
- CLIFF, A.D.; ORD, J.K. **Spatial processes: Models and applications**. London: Pion, 1981.
- COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, v.47, n.3, p. 855-863. 1993.

- CROW, J.F.; AOKI, K. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 81, p. 6073-6077. 1984.
- DEWEY, S.E.; HEYWOOD, J.S. Spacial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. I. Distribution of genotypes. **Evolution**, v.42, n.4, p. 834-838. 1988.
- EGUIARTE, L.E.; BÚRQUEZ, A.; RODRÍGUEZ, J.; MARTINEZ-RAMOS, M.; SARUKHÁN, J.; PIÑERO, D. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocarium mexicanum*. **Evolution**, v.47, n.1, p. 75-87. 1993.
- EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, N.; PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocarium mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, v.69, p. 217-228. 1992.
- EGUIARTE, L.E.; PIÑERO, D. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. **Ciencias**, Número especial 4, p. 34-47. 1990.
- ELLSTRAND, N.C; ELAM, D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.24, p. 217-242. 1993.
- ENDLER, J.A. **Natural selection in the wild**. Princeton N.J.: Princeton University Press, 1986.
- EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L; WEIR, B.S. (Ed.). **Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1990. p. 229-253.
- EPPERSON, B.K.; ALLARD, R.W. Spacial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. **Genetics**, v.121, p. 369-377. 1989.
- FACCHINI, J.A. Situação presente do abastecimento e consumo de madeiras duras. **Silvicultura em São Paulo**, v.7, p. 19-24. 1970.
- FANTINI, A.C.; REIS, A.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P. Sustained yield management in tropical forest: a proposal based on the autoecology of the species. **Sellowia**, v.42/44, p. 25-33. 1992.

- FAO. **A guide to *in situ* genetic conservation of genetic resources of tropical woody species.** Based on the work of L. ROCHE and M.J. DOUROJEANNI. Rome: FAO, 1984. 196p.
- FINOL URDANETA, H.; MELCHIOR, G.H. Unos apuntes sobre la conservación de reservorios de genes de espécies forestales indígenas de actual valor en Venezuela. **Revista Forestal Venezolana**, v.12, n.19/20, p. 73-81. 1970.
- FISHER, R.A. **The genetical theory of natural selection.** Oxford: Clarendon Press, 1958.
- FOWLER, D.P.; MORIS, R.W. Genetic diversity in red pine: Evidence for low heterozygosity. **Canadian Journal of Forest Resources**, v.7, p. 341-347. 1977.
- FRANKLIN, Y. R. Evolutionary change in small populations. In: SOULÉ, M.E.; WILCOX, B.A. (Ed.). **Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective.** Sunderland, Mass: Sinauer, 1980. p. 135-150.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Dossiê Mata Atlântica.** São Paulo, 1992. 119p.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados do domínio da Mata Atlântica no período 1985-1990. Estado de São Paulo.** 1993. 22p.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1993. 631p.
- GAN, Y.Y.; ROBERTSON, F.W.; ASHTON, P.S.; SOEPADMO, E; LEE, D.W. Genetic variation in wild populations of rain-forest trees. **Nature**, v.269, n.5626, p. 323-324. 1977.
- GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y.S.; RODERJAN, C.V. Levantamento fitossociológico das principais associações arbóreas da Floresta Nacional de Irati - PR. **Floresta**, v. XIX, n.1/2, p. 30-49. 1989.
- GANDARA, F.B. Enxertia em *Cedrela fissilis*: Vell. (Meliaceae): utilização para conservação e estudos de variabilidade genética. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1 e CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7, Curitiba-PR, 1993. **Anais**, Curitiba-PR, 1993. v.2, p. 427-429.
- GANDARA, F.B. Diversidade genética e taxa de cruzamento em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Campinas-SP, 1996. 69p. Dissertação (Mestrado) - IB - UNICAMP.

- GLOVER, D.E.; BARRET, S.C.H. Genetic variation in continental and island populations of *Eichornia paniculata* (Ponteriaceae). **Heredity**, v.59, p. 7-17. 1987.
- GOVINDARAJU, D.R. A note on the relationship between outcrossing rate and gene flow in plants. **Heredity**, v.61. p. 401-404. 1988a.
- GOVINDARAJU, D.R. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. **Oikos**, v.52, p. 31-35. 1988b.
- GOVINDARAJU, D.R. Estimates of gene flow in forest trees. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.37, p. 345-357. 1989.
- GROMBONE, M.T.; BERNACCI, L.C.; MEIRA NETO, J.A.A.; TAMASHIRO, J.Y.; LEITÃO FILHO, H.F. Estrutura fitossociológica da floresta semidecídua de altitude do Parque Municipal da Grota Funda (Atibaia - Estado de São Paulo). **Acta Botânica Brasileira**, v.4, n.2, p. 47-64. 1990.
- GURGEL FILHO, O.A.; MORAES, J.L; GURGEL GARRIDO, L.M.A. Silvicultura de essências indígenas sob povoamentos homóclitos coetêneos experimentais. VIII - peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron* M. Arg.). In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2, São Paulo-SP, 1992. **Revista do Insituto Florestal**. São Paulo-SP: Instituto Florestal, 1992. v.4 (único/parte 3), p. 878-883.
- HALL, P.; ORRELL, L.C.; BAWA, K.S.. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis*. **American Journal of Botany**, v.81, p. 1104-1111. 1994.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation: A reference for managing wild animal and plant populations**. Melo Park, California: Benjamin Cummings, 1983. p. 335-348.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.). **Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources**. Sunderland, Mass.: Sinauer, 1990. p. 43-63.

- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.10, p. 173-200. 1979.
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v.18, n.3, p. 201-207. 1986.
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: BOCK, J.H.; LINHART, Y.B. (Ed.). **The evolutionary ecology of plants**. Boulder, CO: Westview Press, 1989. p. 129-146.
- HAMRICK, J.L. ; MITTON, J.B.; LINHART, Y.B. Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. In: M.T. CONCKLE, (Ed.), **Isozymes of north-american forests trees and forest insects**. Pacific SW For. Range Expt. Sta Tech. Report # 48, 1981. p. 35-41.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A. The breeding structure of tropical tree populations. **Plant Species Biology**, v.5, p. 157-165. 1990.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, v.7, p. 395-399. 1991.
- HARRITT, M. M. Ecology and genetic variation of four hardwoods of Brazil's atlantic forest region. Raleigh, USA, 1991. 204p. Thesis (PhD) - North Carolina State University.
- HEYWOOD, J.S.; FLEMING, T.H. Patterns of allozyme variation in three Costa Rican species of *Piper*. **Biotropica**, v.18, n.3, p. 208-213. 1986.
- HILL, R. J.; PRANCE, G.T; MORI, S.A; STEWARD, W.C; SHIMABUKURU, D.; BERNARDI, J. Estudo eletroforético da dinâmica de variação genética em três taxa ribeirinhos ao longo do rio Solimões, América do Sul. **Acta Amazônica**, v.8, n.2, p. 183-199. 1978.
- HUTCHINGS, M.J. The structure of plant populations. In: CRAWLEY M.J. (Ed.). **Plant Ecology**. Oxford: Sci. Publ, 1986. p. 97-136.
- HUZINKER, J.H.; SCHAAL, B.A. Isozyme variation in diploid and octaploid subtropical-temperate species of *Bulnesia*. **The Journal of Heredity**, v.74, p.358-360. 1983.

- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991. 123p.
- INOUE, M.T. Bases ecofisiológicas para a silvicultura de espécies nativas. In: INOUE, M.T.; REICHMANN NETO, F.; CARVALHO, P.E.R.; TORRES, M.A.V. **A silvicultura de espécies nativas**. Curitiba: FUPEF, 1983. p. 1-18.
- IPEF/EMBRAPA. **Conservação de recursos genéticos de essências florestais: relatório final**. Piracicaba-SP: IPEF, 1981. 117p.
- ISABEL, N.; BEAULIEU, J.; BOUSQUET, J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 92, p. 6369-6373. 1995.
- JANZEN, D.H. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. **The American Naturalist**, v.104, n.940, p. 501-528. 1970.
- KAGEYAMA, P.Y. Conservação "in situ" de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, v.35, p. 7-37. 1987.
- KAGEYAMA, P.Y.; BIELLA, L.C.; PALERMO Jr, A. Plantações mistas com espécies nativas com fins de proteção a reservatórios. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6, Campos do Jordão-SP, 1990. **Anais**. 1991.
- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3. **Anais**. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1993. p. 115-125.
- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analyses of techniques. **American Journal of Botany**, v.77, n.5, p. 693-712. 1990.
- KITAMURA, K.; RAHMAN, M.Y.B.A. Genetic diversity among natural populations of *Agathis borneensis* (Araucariaceae), a tropical rain forest conifer from Brunei Darassalam, Borneo, Southeast Asia. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p. 1945-1949. 1992.
- KLEIN, R.M. A vegetação florestal. In: BIGARELLA, J.J. **Visão integrada da problemática da erosão**. Curitiba: ADEA/IBGE, 1985. p. 71-91.

- LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v.241, p. 1455-1461. 1988.
- LEITE, P.F.; KLEIN, R.M. ; PASTORE, U.; COURA NETO, A.B. **A vegetação da área de influência do reservatório da Usina Hidrelétrica de Ilha Grande (PR/MS)** (Levantamento na escala 1:250.000). Brasília: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1986. 52p.
- LEPSCH-CUNHA, N. I. Variabilidade genética de duas espécies de baixa densidade na Amazônia Central: *Couratari multiflora* (J. E. Smith) Eyma e *Couratari guianensis* Aublet. II. Fenologia e sistema reprodutivo de *Couratari multiflora* (J. E. Smith) Eyma. Piracicaba-SP, 1996. 131p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo.
- LI, C.C.; HORVITZ, D.G. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **American Journal of Human Genetics**, v.5, p. 107-117. 1953.
- LIENGSIRI, C.; YEH, F.C.; BOYLE, T.J.B. Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. in Thailand. **Forest Ecology and Management**, v.74, p. 13-22. 1995.
- LOPES, C.R.; DOS REIS, S.F.; FERREIRA, M.A.; MORETZSOHN, M.C. Genetics of the genus *Acrocomia* (Palmae). III Microgeographical genetic variability in isozyme frequencies. **Journal of Genetics and Breeding**, v.46, p. 9-14. 1992.
- LOPEZ, J.A.; LITTLE JUNIOR, E.L.; RITZ, G.F.; ROMBOLD, J.S.; HAHN, W.J. **Arboles comunes del Paraguay; ñande yvyra mata kera**. Washington: Cuerpo de Paz, 1987. 425p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Editora Plantarum. Ltda, 1992. 352p.
- LOVELESS, M.D; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, p. 65-95. 1984.
- LOVELESS, M.D; HAMRICK, J.L. Distribución de la variation genética en espécies arbóreas tropicales. **Revista de Biología Tropical**, v.35, p. 164-176. 1987.
- LUNDKVIST, K.; RUDIN, D. Genetic variation in eleven populations of *Picea abies* as determined by isozyme analysis. **Hereditas**, v.85, p. 67-74. 1977.

- MARCONDES-FERREIRA NETO, W. *Aspidosperma* Mart., *nom. cons.* (Apocynaceae): estudos taxonômicos. Campinas-SP, 1988. 452p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia / Universidade de Campinas.
- MARTINS, F.R. **Estrutura de uma floresta mesófila**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1991. 246p.
- MARTINS, F.R.; CAVASSAN, O.; CESAR, O. Fitossociologia da vegetação arbórea da Reserva Estadual de Bauru, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.7, n.2, p. 91-106. 1984.
- MATTHES, L.A.F.; LEITÃO FILHO, H.F.; MARTINS, F.R. Bosque dos Jequitibás (Campinas, SP): composição florística e estrutura fitossociológica do estrato arbóreo. In: Congresso SBSP, 5. **Anais**. 1988. p. 55-76.
- MORA, A.L.; BETOLOTI, G.; SIMÕES, J.W. **Espécie florestal para alimentação de fauna silvestre**. Piracicaba: IPEF, 1980. 4p (IPEF - Circular Técnica, 93).
- MORAN, G.F.; MUONA, O.; BELL, C.J. Breeding systems and genetic diversity in *Acacia auriculiformis* and *A. crassicarpa*. **Biotropica**, v.21, n.3, p. 250-256. 1989a.
- MORAN, G.F.; MUONA, O.; BELL, C.J. *Acacia mangium*: a tropical forest tree of the coastal lowlands with low genetic diversity. **Evolution**, v.43, p. 231-235. 1989b.
- MORAES, M.L.T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F. F. e M. F. Allemão - Anacardiaceae. Piracicaba-SP, 1992. 139p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo.
- MORELLATO, L.P.C. Estudo da fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. Campinas-SP, 1991. 176p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia / Universidade de Campinas.
- MURAWSKI, D.A.; BAWA, K.S. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **American Journal of Botany**, v.81, p. 155-160. 1994.
- MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lanka tropical rain forest. **Biotropica**, v.26, n.1, p. 23-29. 1994.

- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. The effect of density of flowering individuals on the mating system of nine tropical tree species. **Heredity**, v.67, p. 167-174. 1991.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Panama. **Journal of Heredity**, v.83, p. 401-404. 1992a.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. HUBBELL, S.P.; FOSTER, F.B. Mating system of two bombacaceous trees of a neotropical moist forest. **Oecologia**, v.82, p. 501-506. 1990.
- NAMKOONG, G. Biodiversity - issues in genetics, forestry and ethics. **The Forestry Chronicle**, v.68, n.4, p. 438-443. 1992.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.70, n.12, p. 3321-3323. 1973.
- NEI, M. Molecular population genetics and evolution. In: NEUBERGER, A.; TATUM, E. L. (Ed.). **Frontiers of Biology**. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1975. v. 40.
- NEI, M. F-Statistic and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v.41, p. 225-233. 1977.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.
- NOGUEIRA, J.C.B. A flora do Município de Bauru. **Silvicultura em São Paulo**, v.10, p. 45-54. 1976.
- NOGUEIRA, J.C.B.; SIQUEIRA, A.C.M.F. Plantio da peroba rosa (*Aspidospera polyneuron* Muell. Arg.) de duas procedências para estudo comparativo. **Silvicultura em São Paulo**, v.10, p. 61-63. 1976.
- O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb & Bonpl.): Lecythidaceae. 2. Mating system. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p. 929-932. 1988.
- PAGANO, S.N. e LEITÃO FILHO, H.F. Composição florística do estrato arbóreo de mata mesófila semidecídua, no município de Rio Claro (Estado de São Paulo). **Revista Brasileira de Botânica**, v.10, p. 37-47. 1987.

- PAIVA, J.R. Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Muell. Arg.). Piracicaba-SP, 1992. 145p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo.
- PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOSKI, R.; CONTEL, P.B. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Muell. Arg.). 1. Genetic variation in natural populations. **Silvae Genetica**, v.43, n.5/6, p. 307-312. 1994.
- PÉREZ-NASSER, N.; EGUIARTE, L.E.; PIÑERO, D. Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v.80, n.1, p. 45-52. 1993.
- REIS, M.S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius). Piracicaba-SP, 1996. 210p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo.
- RIZZINI, C.T. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica (florístico-sociológica) do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**, v.25, p. 3-64. 1963.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. Manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. 1990. 304p.
- RODRIGUES, R.R.; TAMASHIRO, J.Y.; SHEPHERD, G.J.; SANTOS, F.M. **Revista Brasileira de Botânica**. (submetido)
- RUDIN, D. Gene and genotype frequencies in swedish scots pine populations studied by isozyme techniques. **Hereditas**, v.78, p. 325. 1974.
- SANTOS, E.M.G. Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae). Piracicaba-SP, 1994. 114 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo.
- SCHLITTLER, F.H.M. Florística e fitossociologia da reserva do Morro do Diabo. Rio Claro-SP, 1990. 279p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências / Universidade Estadual Paulista.
- SLATKIN, M. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequency local extinction. **Theoretica Population Biology**, v.12, p. 253-262. 1977.

- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.16, p. 393-430. 1985.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v.236, p.787-792. 1987.
- SCHMUTZ, J. Phytochemische betrachtungen zum genus *Aspidosperma*. **Pharm. Acta. Helv.** v.36, p. 103-118. 1960.
- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spacial autocorrelation in biology. 1. Methodology. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.10, p. 199-228. 1978a.
- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spacial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.10, p. 229-249. 1978b.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.L. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v.73, n.1, p. 9-26. 1983.
- SOUZA, L.A. de; MOSCHETA, I.S. Morfo-anatomia do fruto e da plântula de *Aspidosperma polyneiron* M. Arg. (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.52, n.3, p.439-447. 1992.
- STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. **Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.)**. Raleigh, North Caroline: North Caroline State University, 1988. 87p. (Technical Bulletin 286)
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. **Biosys-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics**: Release 1,7. Illinois: Illinois Natural History Survey, 1989. 43p.
- SYSTMA, K.J.; SCHAAL, B.A. Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozyme data. **Evolution**, v.39, p. 582-593. 1985.
- TABANEZ, A.A.J. Ecologia e manejo de ecounidades em um fragmento florestal da região de Piracicaba-SP. Piracicaba-SP, 1995. 85p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo.

- TOKUNAGA, T.; OHNISHI, O. Spatial autocorrelation analysis of allozyme variants within local sites of wild radish population. **Japan Journal of Genetics**, v.67, p. 209-216. 1992.
- VIANA, V.M. Seed dispersal and gap regeneration: the case of three amazonian tree species. Cambridge, 1989. 270p. Thesis (PhD) - Harvard University.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: Methods for discrete populations genetic data**. Sunderland Sinauer Associates, 1990. 377p.
- WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E. e SOLTIS, P.S. (Ed.) **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. p. 5-45.
- WICKNESWARI, R.; NORWATI, M. Genetic diversity of natural populations of *Acacia auriculiformis*. **Australian Journal of Botany**, v.41, p. 65-77. 1993.
- WOODSON, R.E. Studies in the Apocynaceae. VIII. An interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.38, n.1, p. 119-204. 1951.
- WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**, v.6, p. 111-78. 1921.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**, v.5, p. 395-420. 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to system of mating. **Evolution**, v.19, p. 395-420. 1965.
- WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**, vol IV. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 580p.
- WHITLOCK, M.C. Temporal fluctuations in demographic parameters and the genetic variance among populations. **Evolution**, v.46, n.3, p. 608-615. 1992.
- YEH, F.C.; O'MALLEY, D. Enzyme variations in natural populations of douglas-fir, *Pseudotsuga Menziesii* (Mirb.) Franco, from British Columbia. I. Genetic variation patterns in coastal populations. **Silvae Genetica**, v.29, p. 83-92. 1980.

## ANEXOS

# 1. PROTOCOLOS PARA REVELAÇÃO DOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO

a) **Fosfoglucomutase (PGM)** - modificado a partir de SOLTIS et al. (1983):

- Glucose - 1 - fosfato .....	125 mg
- EDTA .....	25 mg
- NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub> .....	10 mg (1ml)
- MTT.....	10 mg (1ml)
- PMS .....	1 mg (1ml)
- MgCl <sub>2</sub> .....	10 mg (1ml)
- Tris-HCl 0,1M pH 8,0-8,5 .....	50 ml
- glucose-6-fosfato desidrogenase .....	0,02 ml (20 un)

Procedimento: Diluir todos os reagentes no tampão e imergir o gel nesta solução. Incubar por 40 minutos no escuro a 35°C.

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

- ácido 6-fosfogluconico, Na <sub>3</sub> .....	40 mg
- NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub> .....	20 mg (2ml)
- MTT.....	20 mg (2ml)
- PMS .....	2 mg (2ml)
- MgCl <sub>2</sub> .....	20 mg (2ml)
- Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 (q.s.p.).....	50 ml

Procedimento: Diluir todos os reagentes no tampão e imergir o gel nesta solução. Incubar por 40 minutos no escuro a 35°C.

c) **Fosfoglucoose Isomerase (PGI)** - modificado a partir de SOLTIS et al. (1983):

- frutose-6-fosfato, Na <sub>2</sub> .....	37,5 mg
- NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub> .....	10 mg (1ml)
- MTT.....	10 mg (1ml)
- PMS .....	1 mg (1ml)
- MgCl <sub>2</sub> .....	10 mg (1ml)
- Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 (q.s.p.).....	50 ml
- glucose-6-fosfato desidrogenase .....	0,01 ml (10 un)

Procedimento: Diluir todos os reagentes no tampão e imergir o gel nesta solução. Incubar por 40 minutos no escuro a 35°C.

d) **Leucine Aminopeptidase (LAP)** - PAIVA (1992)

- L-leucine .....25mg (diluídos em 2ml de metanol a 10%)
- Fast Black .....30mg (diluídos em 2ml de metanol a 10%)
- tampão Tris-maleato 0.1M pH 5.4 .....20ml
- H<sub>2</sub>O destilada.....50ml

Procedimento: Misturar todos os reagentes com a água e o tampão. Incubar o gel nesta mistura por 40 minutos, no escuro, a 35°C.

e) **Malato Desidrogenase (MDH)** - modificado a partir de SOLTIS et al. (1983):

- ácido málico 2,0 M, pH 8,0 .....4 ml
- NAD<sup>+</sup>, Na<sub>2</sub>.....10 mg
- MTT.....10 mg
- PMS.....1 mg
- tampão Tris-HCl 0,1 ml, pH 8,5 (q.s.p.).....50 ml

Procedimento: Diluir todos os reagentes no tampão e imergir o gel nesta solução. Incubar por 40 minutos no escuro a 35°C.

f) **Peroxidase (PO)** - 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%).....1,5 ml

Procedimento: Diluir a O-dianisidina no etanol, acrescentando-se em seguida o tampão acetato de sódio. Imergir os géis nesta solução e incubar no escuro a 35°C. Após 30 minutos acrescentar a água oxigenada. A revelação das bandas ocorre em 2 a 3 minutos.

g) **Xiquimato Desidrogenase (SKDH)** modificado a partir de ALFENAS et al. (1991)

- ac. xiquímico .....80 mg
- NADP<sup>+</sup>, Na<sub>2</sub>.....10 mg (1ml)
- MTT.....10 mg (1ml)
- PMS .....1 mg (1ml)
- Tris-HCl 0,1M pH 8,5 .....50 ml

Procedimento: Diluir todos os reagentes no tampão e imergir o gel nesta solução. Incubar por 40 minutos no escuro a 35°C.

## 2. ESPÉCIES ARBÓREAS TROPICAIS ESTUDADAS VIA MARCADORES ALOZÍMICOS

Tabela 22: Estimativas da diversidade genética de diversas espécies arbustivo/arbóreas tropicais já estudadas via marcadores alozímicos: taxa de polimorfismo ( $\hat{P}$ ), número de alelos por loco ( $\hat{A}$ ), número de alelos por loco polimórfico ( $\hat{A}_p$ ), heterozigidade total ( $\hat{H}_T$ ), heterozigidade dentro de populações ( $\hat{H}_S$ ), heterozigidade observada ( $\hat{H}_o$ ), heterozigidade esperada ( $\hat{H}_e$ ). Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

Espécie*	Local	P (%)	A	$A_p$	$\hat{H}_T$	$\hat{H}_S$	$H_o$	$\hat{H}_e$
<i>Acacia auriculiformis</i> (1)	Austrália							0,084
<i>Acacia auriculiformis</i> (2)	Austrália e Papua Nova Guiné	39,8 (8,3-75,0)**	1,50		0,134	0,098	0,071 (0,002-0,162)	0,081 (0,002-0,180)
<i>Acacia auriculiformis</i> (3)	Austrália				0,146			0,126
<i>Acacia auriculiformis</i> (3)	Papua Nova Guiné							0,166
<i>Acacia crassicarpa</i> (1)	Papua Nova Guiné							0,081
<i>Acacia crassicarpa</i> (3)	Austrália				0,141			0,131
<i>Acacia crassicarpa</i> (3)	Papua Nova Guiné							0,150
<i>Acacia deabalia</i> (1)	Austrália							0,085
<i>Acacia decurrens</i> (1)	Austrália							0,156
<i>Acacia mangium</i> (1)	Austrália, Papua Nova Guiné e Indonésia	12,7 (0,0-43,4)	1,14 (1,00-1,50)		0,025	-	0,015 (0,000-0,040)	0,017 (0,000-0,044)
<i>Acacia mearnsii</i> (1)	Austrália							0,206
<i>Acacia melanoceros</i> (4)	IBC-Panamá	30,3						0,107
<i>Acacia melanoxylon</i> (1)	Austrália							0,300
<i>Acacia parramattensis</i> (1)	Austrália							0,179
<i>Acacia trachyphloia</i> (1)	Austrália							0,083
<i>Acalypha diversifolia</i> (5)	IBC-Panamá	42,3	1,89	3,11				0,194
<i>Acalypha diversifolia</i> (6)	IBC-Panamá				0,378	0,344		
<i>Acrocomia aculeata</i> (7)	Amazônia - Brasil	100,0	2,00				0,182 (0,042-0,667)	0,375 (0,087-0,499)
<i>Aeshynomene sensitiva</i> var. <i>sensitiva</i> (8)	Amazônia - Brasil	23,8						(0,184-0,364)
<i>Aeshynomene sensitiva</i> var. <i>amazonica</i> (8)	Amazônia - Brasil	18,8						(0,100-0,425)
<i>Aghatis borneensis</i> (9)	Bornéu-Indonésia	27,8	1,41		0,122	0,106		0,122
<i>Alseis blackiana</i> (10)	IBC-Panamá							0,340
<i>Alseis blackiana</i> (5)	IBC-Panamá	54,2	1,92	2,70				0,205
<i>Alseis blackiana</i> (6)	IBC-Panamá				0,423	0,412		
<i>Astrocaryum mexicanum</i> (11)	Los Tuxtlas-México	31,8	1,36	2,14				0,153
<i>Bauhinia forficata</i> (12)	Mata Atlântica -Brasil	100,0	3,75				0,451	0,503

Tabela 22: continuação

<i>Bertholletia excelsa</i> (13)	Amazônia - Brasil	54,3								0,190
<i>Bowdichia virgiloides</i> (14)	Mata Atlântica -Brasil	28,0								0,126
<i>Brosimum alicastrum</i> (5)	IBC-Panamá	28,6	1,48		02,67					0,125
<i>Bulnesia arborea</i> (15)	Colômbia	28,6								
<i>Bulnesia carrapo</i> (15)	Colômbia	22,7								
<i>Carapa guianensis</i> (16)	La Selva-Costa Rica	35,0	1,18				0,342	0,313		0,120
<i>Cariniana legalis</i> (14)	Mata Atlântica - Brasil	30,0								0,140
<i>Cavallinesia platanifolia</i> (4)	IBC-Panamá	31,0								0,123
<i>Cecropia insignis</i> (5)	IBC-Panamá	32,3	1,52		2,62					0,103
<i>Cedrela fissilis</i> (17)	Mata Atlântica -Brasil	76,9	2,31		2,70			0,222		0,243
<i>Ceiba pentandra</i> (5)	IBC-Panamá	30,8	1,43		2,40					0,106
<i>Cordia alliodora</i> (18)	La Selva-Costa Rica	44,0 (30,0-64,0)	1,73 (1,50-2,09)				0,127			0,143 (0,084-0,193)
<i>Cordia trichotoma</i> (14)	Mata Atlântica - Brasil	40,0								0,184
<i>Couratari multiflora</i> (19)	Amazônia - Brasil	100,0	3,25					0,359		0,436
<i>Couratari guianensis</i> (19)	Amazônia - Brasil	100,0	2,75					0,203		0,429
<i>Dipterix panamensis</i> (5)	IBC-Panamá	22,6	1,34		2,50					0,074
<i>Eichornia paniculata</i> (20)	Brasil						0,150	0,090		
<i>Enterolobium schomburkii</i> (4)	IBC-Panamá	27,6								0,122
<i>Erythrina costaricensis</i> (5)	IBC-Panamá	41,5	1,70		2,69					0,152
<i>Euterpe edulis</i> (21)	Mata Atlântica - Brasil	(71,4-100,0)	3,4				0,452	0,446	0,467 (0,385-0,570)	0,452 (0,405-0,496)
<i>Faramea occidentalis</i> (5)	IBC-Panamá	0,0	1,00							0,000
<i>Ficus costarincana</i> (4)	IBC-Panamá	84,2								0,248
<i>Ficus maxima</i> (4)	IBC-Panamá	35,0								0,136
<i>Ficus obtusifolia</i> (4)	IBC-Panamá	84,2								0,254
<i>Ficus popenoi</i> (4)	IBC-Panamá	66,7								0,158
<i>Gustavia superba</i> (5)	IBC-Panamá	34,5	1,73		3,11					0,134
<i>Hevea brasiliensis</i> (22)	Amazônia - Brasil	100,0	4,2				0,336	0,335		
<i>Hevea brasiliensis</i> (23)	Acre - Brasil	82,5 (70,0-90,0)			2,8 (2,4-3,1)				0,299 (0,250-0,343)	0,324 (0,260-0,363)
<i>Hevea brasiliensis</i> (23)	Rondônia - Brasil	21,3 (50,0-100,0)			2,6 (2,4-3,0)				0,299 (0,183-0,500)	0,322 (0,209-0,458)
<i>Hevea brasiliensis</i> (23)	Mato Grosso-Brasil	26,3 (90,100-0)			2,7 (2,6-2,9)				0,380 (0,313-0,441)	0,421 (0,368-0,470)
<i>Hirtella triandra</i> (5)	IBC-Panamá	36,7	1,57		2,56					0,142
<i>Hura crepitans</i> (5)	IBC-Panamá	20,6	1,35		2,71					0,081
<i>Hybanthus prunifolius</i> (5,6)	IBC-Panamá	30,8	1,31		2,00		0,351	0,335		0,116
<i>Inga minutula</i> (4)	IBC-Panamá	68,0								0,240
<i>Jacaranda copaea</i> (5)	IBC-Panamá		1,36							0,090
<i>Joanesia princeps</i> (14)	Brasil									0,141
<i>Koanophyllon weinmorei</i> (4)	IBC-Panamá	25,0								0,095
<i>Lisianthus skinneri</i> (24)	Panamá	13,1	2,0				0,526	0,052		0,035



Tabela 22: continuação

média de 29 espécies (5)	IBC-Panamá	28,0	1,45	0,111		
média de 16 espécies comuns(30)	IBC-Panamá	60,9				0,211

\* a referência se encontra entre parêntese

\*\* amplitude encontrada para as populações analisadas

\*\* somente locos polimórficos

- |                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 1 - MORAN et al. (1989b)         | 16 - HALL et al. (1994)         |
| 2 - WICKNESWARI e NORWATI (1993) | 17 - GANDARA (1996)             |
| 3 - MORAN et al. (1989a)         | 18 - CHASE et al. (1995)        |
| 4 - HAMRICK e MURAWSKI (1991)    | 19 - LEPSCH-CUNHA (1996)        |
| 5 - HAMRICK e LOVELESS (1986)    | 20 - GLOVER e BARRET (1987)     |
| 6 - LOVELESS e HAMRICK (1987)    | 21 - REIS (1996)                |
| 7 - LOPES et al. (1992)          | 22 - PAIVA et al. (1994)        |
| 8 - HILL et al. (1978)           | 23 - CHEVALLIER (1988)          |
| 9 - KITAMURA e RAHMAN (1992)     | 24 - SYSTMA e SCHAAL (1985)     |
| 10 - HAMRICK e MURAWSKI (1990)   | 25 - MORAES (1992)              |
| 11 - EGUIARTE et al. (1992)      | 26 - HEYWOOD e FLEMING (1986)   |
| 12 - SANTOS (1994)               | 27 - PÉREZ-NASSER et al. (1993) |
| 13 - BUCKLEY et al. (1988)       | 28 - LIENGSIRI et al. (1995)    |
| 14 - HARRITT (1991)              | 29 - MURAWSKI e BAWA (1994)     |
| 15 - HUZINKER e SCHAAL (1983)    | 30 - HAMRICK e LOVELESS (1989)  |

**Tabela 23:** Distribuição da variabilidade genética entre populações (adultos) através das estimativas de  $G_{ST}$  e  $F_{ST}$  e da taxa de fluxo gênico ( $\hat{N}m$ ) de diversas espécies arbustivo/arbóreas tropicais já estudadas via marcadores alozímicos. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

<b>Espécie</b>	<b>Local</b>	$\hat{G}_{ST}$	$\hat{F}_{ST}$	$\hat{N}m$	<b>Referência</b>
<i>Acacia auticuliformis</i>	Austrália	0,182			MORAN et al. (1989a)
<i>Acacia auticuliformis</i>	Austrália e Papua Nova Guiné	0,270			WICKNESWARI e NORWATI (1993)
<i>Acacia crassicarpa</i>	Austrália e Papua Nova Guiné	0,093			MORAN et al. (1989a)
<i>Acacia mangium</i>	Austrália	0,311			MORAN et al. (1989b)
<i>Acalypha diversifolia</i>	IBC-Panamá	0,094		1,07	LOVELESS e HAMRICK (1987)
<i>Aghatis borneensis</i>	Bornéio	0,140		1,26	KITAMURA e RAHMAN (1992)
<i>Alseis blackiana</i>	IBC-Panamá	0,043		2,47	LOVELESS e HAMRICK (1987)
<i>Astrocarium mexicanum</i>	Los Tuxlas-México			1,20-19,70	EGUIARTE et al. (1993)
<i>Astrocarium mexicanum</i>	Los Tuxlas-México		0,041	3,40	EGUIARTE et al. (1992)
<i>Bertholletia excelsa</i>	Amazônia - Brasil	0,037		3,35	BUCKLEY et al. (1988)
<i>Carapa guianensis</i>	La Selva-Costa Rica	0,046		4,10	HALL et al. (1994)
<i>Cariniana legalis</i>	Mata Atlântica - Brasil		0,053	1,13	HARRITT (1991)
<i>Cecropia obtusifolia</i>	Los Tuxlas-México		0,029	24,9	ALVAREZ-BUYLLA e GARAY (1994)
<i>Cordia alliodora</i>	La Selva-Costa Rica	0,117			CHASE et al. (1995)
<i>Cordia tichotoma</i>	Mata Atlântica - Brasil		0,0004	312,4	HARRITT (1991)
<i>Eichornia paniculata</i>	Brasil	0,570	0,324		GLOVER e BARRET (1987)
<i>Euterpe edulis</i>	Floresta Atlântica - Brasil	0,013	0,031	10,70	REIS (1996)
<i>Hevea brasiliensis</i>	Amazônia - Brasil	0,0003	0,030	416,10	PAIVA et al. (1994a, 1994b)
<i>Hybanthus prunifolius</i>	IBC-Panamá	0,041		2,30	LOVELESS e HAMRICK (1987)
<i>Joanesia princeps</i>	Mata Atlântica - Brasil		0,069	1,68	HARRITT (1991)
<i>Lisianthus skinneri</i>	Panamá	0,903		0,01	SYSTMA e SCHAAL (1985)
<i>Myracrodum urundeuva</i>	Mata Atlântica e Cerrado - Brasil	0,036	0,049	3,35	MORAES (1992)
<i>Phoenix dactylifera</i>	Argélia	0,067			BENNACER et al. (1991)

Tabela 23: continuação

<i>Piper amalago</i>			0,103		HEYWOOD e FLEMING (1986)
<i>Psychotria faxlucens</i>	Los Tuxlas-México		0,031		PÉREZ-NASSER et al. (1993)
<i>Psychotria horizontalis</i>	IBC-Panamá	0,039		2,74	LOVELESS e HAMRICK (1987)
<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	Tailândia		0,121		LIENGSIRI et al. (1995)
<i>Quararibea asterolepsis</i>	IBC-Panamá	0,021		5,18	LOVELESS e HAMRICK (1987)
<i>Rinorea sylvatica</i>	IBC-Panamá	0,083		1,22	LOVELESS e HAMRICK (1987)
<i>Sorocea affinis</i>	IBC-Panamá	0,047		2,25	LOVELESS e HAMRICK (1987)
<i>Stemonoporus oblongifolius</i>	Sri Lanka-Ásia	0,163		1,96	MURAWSKI e BAWA (1994)
<i>Swartzia simplex</i>		0,035		3,02	LOVELESS e HAMRICK (1987)

Tabela modificada a partir de REIS (1996)

Tabela 24: Índices de fixação dos adultos ( $\hat{F}_{ad}$ ) e da progênie ( $\hat{F}_{prog}$ ) de algumas espécies arbustivo/arbóreas tropicais já estudadas via marcadores alozímicos. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

Espécie	Local	$\hat{F}_{ad}$	$\hat{F}_{prog}$	Referência
<i>Astrocarium mexicanum</i>	Los Tuxlas-México	-0,411	-0,186	EGUIARTE et al. (1992)
<i>Cavallinesia platanifolia</i>	IBC-Panamá	-0,198	0,275- 0,649	MURAWSKI et al. (1990)
<i>Cecropia obtusifolia</i>	Los Tuxlas-México	-0,083	-0,032 (-0,016)*	ALVAREZ-BUYLLA et al. (1996)
<i>Cedrela fissilis</i>	Mata Atlântica-Brasil	0,033	0,099	GANDARA (1996)
<i>Ceiba pentandra</i>	IBC-Panamá	-0,297	0,184	MURAWSKI e HAMRICK (1992)
<i>Couratari guianensis</i>	Amazônia-Brasil	0,518	0,377	LEPSCH-CUNHA (1996)
<i>Couratari multiflora</i>	Amazônia-Brasil	0,166	0,114	LEPSCH-CUNHA (1996)
<i>Euterpe edulis</i>	Mata Atlântica-Brasil	-0,067	0,042	REIS (1996)
<i>Psychotria faxlucens</i>	Los Tuxlas-México	0,115	0,133	PÉREZ-NASSER et al. (1993)
<i>Shorea congestiflora</i>	Sri Lanka-Ásia	0,088	0,067	MURAWSKI et al. (1994)
<i>Shorea megistophylla</i>	Sri Lanka-Ásia	-0,247	0,151	MURAWSKI et al. (1994)
<i>Stemonoporus oblongifolius</i>	Sri Lanka-Ásia	-0,101	0,085	MURAWSKI e BAWA (1994)

\* indivíduos jovens

### 3. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA OS LOCOS POLIMÓRFICOS

Tabela 25: Frequências genotípicas nos 5 locos polimórficos analisados para as populações de **adultos** de *Aspidosperma polyneuron* amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

Loco	Genótipos	População 1				População 2			
		$N_o$	$P_o$	$\hat{N}_e$	$\hat{P}_e$	$N_o$	$P_o$	$\hat{N}_e$	$\hat{P}_e$
Skd-1	1-1	58	96,667	58,017	96,695				
	1-2	2	3,333	1,967	3,278	-	-	-	-
	2-2	0	0,000	0,017	0,028				
Pgi-1	1-1	2	3,175	1,147	1,821	2	3,922	8,647	16,955
	1-2	7	11,111	8,095	12,849	8	15,686	10,706	20,992
	1-3	6	9,524	6,611	10,494	30	58,823	14,000	27,451
	2-2	8	12,698	14,286	22,676	8	15,686	3,314	6,498
	2-3	37	58,730	23,333	37,036	2	3,922	8,667	16,994
	3-3	3	4,7619	9,528	15,124	1	1,961	5,667	11,112
Lap-1	1-1	0	0,000	0,496	0,813	0	0,000	0,005	0,010
	1-2	3	4,918	1,352	2,216	1	2,000	0,570	1,140
	1-3	8	13,115	8,656	14,190	0	0,000	0,420	0,840
	2-2	1	1,639	0,922	1,512	21	42,000	16,245	32,490
	2-3	10	16,393	11,803	19,349	14	28,000	23,940	47,880
	3-3	39	63,934	37,770	61,918	14	28,000	8,820	17,640
6Pgdh-1	1-1	0	0,000	0,065	0,105	0	0,000	0,005	0,010
	1-2	4	6,452	2,935	4,734	1	1,923	0,846	1,627
	1-3	0	0,000	0,935	1,508	0	0,000	0,114	0,219
	2-2	37	59,677	33,391	53,856	38	73,077	37,231	71,598
	2-3	13	20,968	21,282	34,326	11	21,154	12,692	24,408
	3-3	8	12,903	3,391	5,469	2	3,846	1,082	2,081
6Pgdh-2	1-1	12	19,355	12,198	19,674	2	3,846	11,077	21,302
	1-2	31	50,000	30,605	49,363	44	84,615	25,846	49,704
	2-2	19	30,645	19,198	30,964	6	11,539	15,077	28,994

$N_o$  - número observado

$P_o$  - frequência observada

$\hat{N}_e$  - número esperado

$\hat{P}_e$  - frequência esperada

**Tabela 26:** Frequências genotípicas nos 3 locos polimórficos analisados para a amostra de **indivíduos jovens** de *Aspidosperma polyneuron* amostrada na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

<b>Loco</b>	<b>Genótipos</b>	$N_o$	$P_o$	$\hat{N}_e$	$\hat{P}_e$
Pgi-1	1- 1	8	3,540	0,996	0,441
	1- 2	7	3,097	15,000	6,637
	1- 3	7	3,097	13,009	5,756
	2- 2	31	13,717	56,500	25,000
	2- 3	157	69,469	98,000	43,363
	3- 3	16	7,080	42,496	18,803
Lap-1	1- 1	9	4,000	24,338	10,817
	1- 2	130	57,778	99,324	44,144
	2- 2	86	38,222	101,338	45,039
Pgi-1	1- 1	10	24,471	24,471	11,879
	1- 2	122	93,058	93,058	45,174
	2- 2	74	88,471	88,471	42,947

$N_o$  - número observado

$P_o$  - frequência observada

$\hat{N}_e$  - número esperado

$\hat{P}_e$  - frequência esperada

#### 4. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS ESPERADAS NO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E EQUILÍBRIO DE ENDOGAMIA

Tabela 27: Frequências genotípicas esperadas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (ou equilíbrio de panmixia) e no Equilíbrio de Endogamia de Wright, no caso de locos com 3 ou mais alelos. (adaptada por REIS, 1996 a partir de WRIGHT, 1951).

Genótipo	Frequência Esperada	
	Panmixia	Endogamia
$A_1A_1$	$p_1^2$	$p_1^2 + F p_1 (1-p_1)$
$A_1A_2$	$2 (p_1p_2)$	$2 (p_1p_2) (1-F)$
$A_2A_2$	$p_2^2$	$p_2^2 + F p_2 (1-p_2)$
$A_1A_3$	$2 (p_1p_3)$	$2 (p_1p_3) (1-F)$
$A_2A_3$	$2 (p_2p_3)$	$2 (p_2p_3) (1-F)$
$A_3A_3$	$p_3^2$	$p_3^2 + F p_3 (1-p_3)$
$A_1A_n$	$2 (p_1p_n)$	$2 (p_1p_n) (1-F)$
$A_2A_n$	$2 (p_2p_n)$	$2 (p_2p_n) (1-F)$
$A_3A_n$	$2 (p_3p_n)$	$2 (p_3p_n) (1-F)$
$A_nA_n$	$p_n^2$	$p_n^2 + F p_n (1-p_n)$

## 5. RESULTADOS OBTIDOS PARA O ÍNDICE DE MORAN (I) UTILIZANDO O MÉTODO DE CLASSES DE DISTÂNCIA

Tabela 28: Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) em 19 classes de distância, analisando-se 4 alelos na amostra de **indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron*** (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP; distância média entre indivíduos pareados e número de comparações efetuadas. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

Loco	Alelo	Classes de Distância																	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9								
Lap-1	1	0,166	-0,077	-0,056	-0,038	-0,021	-0,016	0,015	-0,023	0,014	0,008								
Pgi-1	2	-0,065	0,068	-0,034	0,026	0,036	-0,007	0,043	-0,023	-0,003	0,014								
Pgi-1	3	0,048	0,063	-0,228*	-0,020	-0,120	-0,024	0,060*	-0,045	0,001	-0,005								
Pgm-1	1	-0,069	-0,133	0,030	0,047	-0,018	-0,022	-0,048	0,041	0,008	-0,006								
I médio		0,020	-0,020	-0,072	0,004	-0,031	-0,017	0,017	-0,012	0,005	0,003								
número de comparações		108,0 (2,708)	52,7 (5,188)	102,5 (8,185)	139,0 (12,000)	96,0 (9,522)	909,0 (94,784)	1095,2 (95,667)	1167,2 (100,937)	2434,2 (180,324)	2247,5 (186,336)								

cont.

Loco	Alelo1	Classes de Distância																	
		10	11	12	13	14	15	16	17	18									
Lap-1	1	0,019	0,012	0,018	-0,022	-0,030	-0,125**	-0,052	-0,229**	-0,197*									
Pgi-1	2	0,013	-0,031*	0,004	-0,029	0,022	-0,024	-0,027	0,016	0,001									
Pgi-1	3	-0,014	-0,021	0,012	-0,008	0,015	0,009	-0,014	-0,028	-0,015									
Pgm-1	1	-0,003	0,011	0,007	-0,011	-0,013	-0,044	-0,016	-0,158*	-0,328**									
I médio		0,004	-0,007	0,010	-0,018	-0,002	-0,046	-0,027	-0,100	-0,135									
número de comparações		2022,0 (166,742)	3741,2 (366,174)	3864,0 (340,934)	3249,5 (264,576)	2053,5 (181,022)	555,0 (63,964)	373,7 (44,086)	215,5 (18,065)	90,0 (0,000)									

Tabela 29: Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) em 14 classes de distância, analisando-se 7 alelos na **População 1** de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP; distância média entre indivíduos pareados e número de comparações efetuadas. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

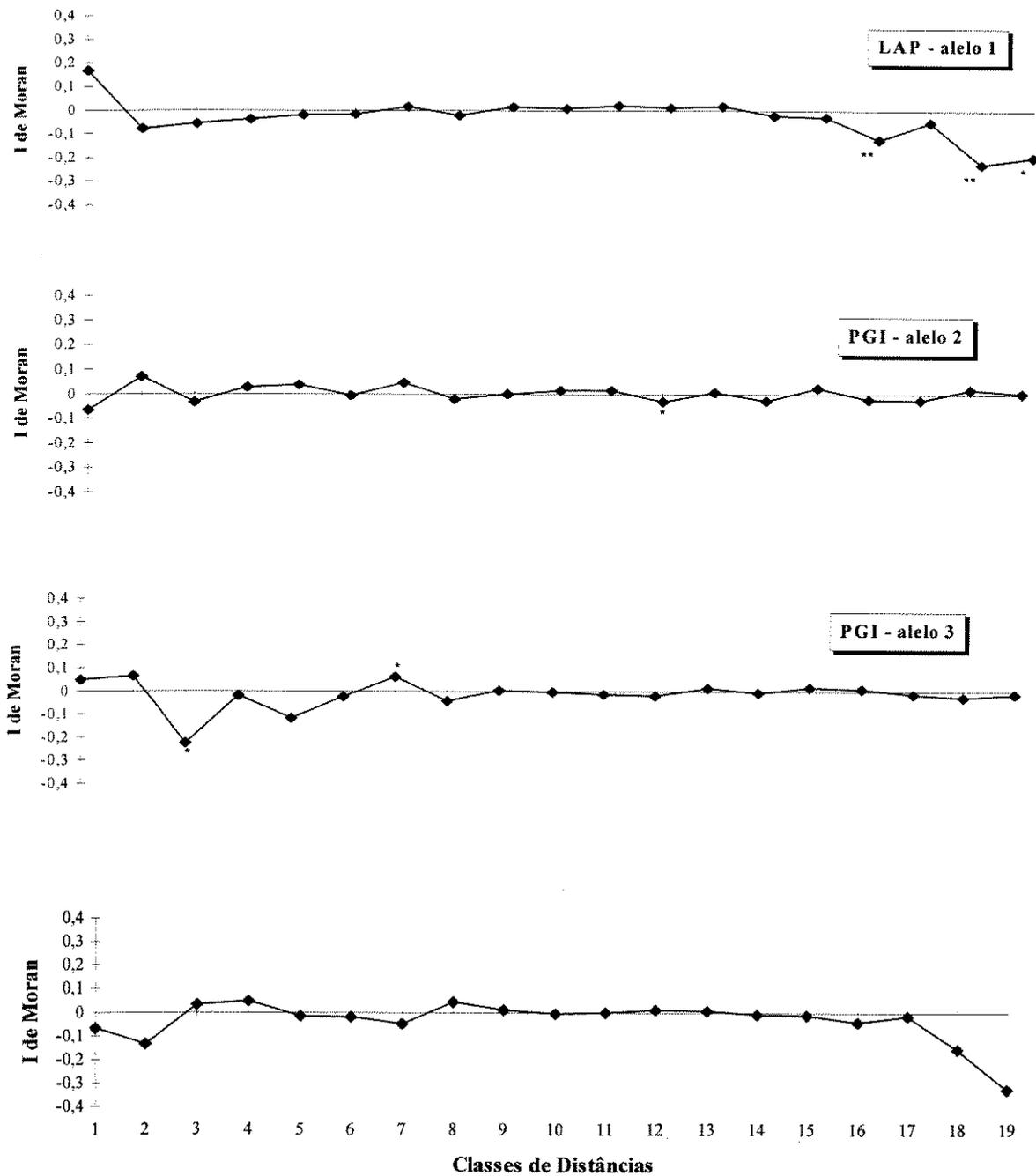
Loco	Alelo	Classes de Distância													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lap-1	2	0,060	-0,051	-	-0,113	0,065	-0,060	0,069	-0,104	-0,047	0,070	0,021	-0,050	-0,009	-0,016
				0,131											
Lap-1	3	0,112	-0,038	0,000	0,099	-0,097	-0,030	0,041	-0,148	-0,158*	0,056	0,051	-0,092	0,015	-0,031
Pgi-1	2	0,214	0,042	0,062	0,017	0,071	0,088	0,106	0,009	-0,032	-0,224**	-0,193**	-0,004	0,130	-0,032
	3	0,086	0,174*	-	0,162	0,135	0,229**	0,144	0,014	-0,016	-0,129	-0,217**	-0,076	-0,178	-0,266**
				0,002											
6Pgdh-1	2	0,239*	-0,159	0,028	-0,006	0,076	0,035	-0,029	-0,017	-0,080	0,028	-0,026	0,035	0,006	-0,059
	3	0,075	-0,035	-	0,035	0,020	-0,075	-0,039	-0,032	-0,093	-0,114	-0,001	0,127	0,104	-0,164
				0,022											
6Pgdh-2	2	0,205	-0,152	0,147	-0,021	-0,039	0,076	-0,236**	-0,077	-0,052	-0,028	-0,082	0,142*	0,105	-0,053
I médio		0,142	-0,031	0,012	0,025	0,033	0,038	0,008	-0,051	-0,068	-0,049	-0,064	0,012	0,025	-0,089
número de comparações		74,2 (1,71)	127 (4,08)	107,7 (3,10)	98,2 (3,77)	109,2 (3,77)	117,7 (5,19)	113 (3,56)	143 (5,60)	167,5 (16,20)	175,5 (6,81)	286,2 (6,50)	169 (8,64)	84 (2,16)	79,5 (20,42)

**Tabela 30:** Resultados obtidos para o Índice de Moran (I) em 14 classes de distância, analisando-se 7 alelos na **População 2** de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP; distância média entre indivíduos pareados e número de comparações efetuadas. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

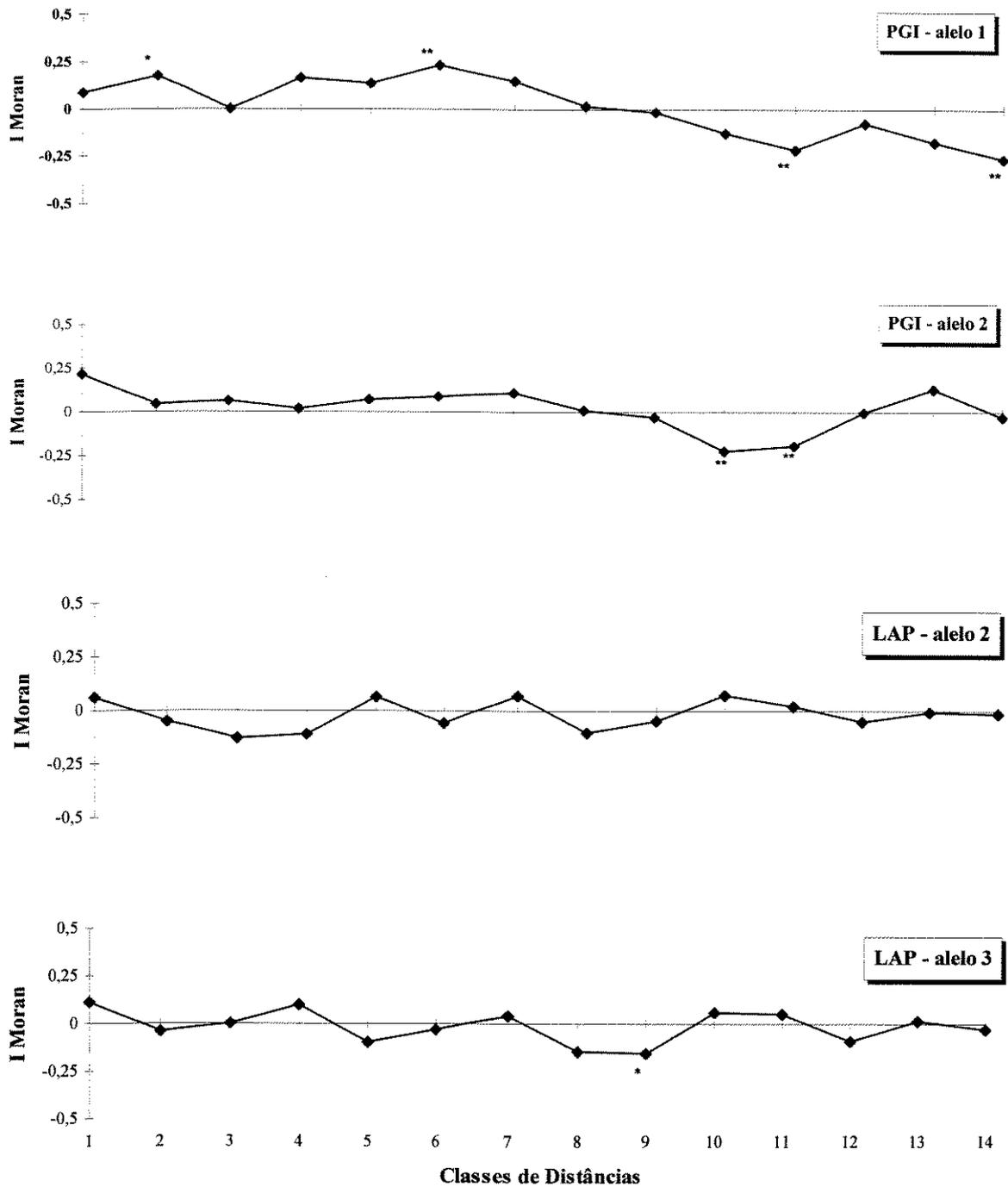
Loco	Alelo	Classes de Distância													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lap-1	2	0,032	-0,298*	0,025	0,070	-0,125	0,056	-0,062	-0,094	0,017	0,019	0,005	-0,023	0,076	-0,042
Lap-1	3	0,019	-0,290*	-0,015	0,058	-0,103	0,014	0,013	-0,078	-0,001	0,036	0,001	-0,037	0,080	-0,051
Pgi-1	1	0,138	-0,067	0,124	0,120	0,071	0,055	-0,035	0,070	-0,097	-0,088	-0,037	-	0,041	-0,005
Pgi-1	3	0,023	-0,133	0,215*	0,030	0,057	0,021	-0,061	0,062	-0,073	-0,142	0,100	-0,102	-0,167	-
6Pgdh-1	2	0,122	0,020	0,046	-0,024	0,153	0,037	-0,007	0,053	-0,015	-0,212*	-0,118	-	-0,050	0,213
6Pgdh-1	3	0,174	-0,049	0,138	-0,046	0,032	0,080	0,046	0,059	0,035	-0,180	0,031	-	0,039	-
6Pgdh-2	2	0,450*	-0,038	-0,104	-0,052	-0,166	-0,043	0,051	-0,011	-0,025	-0,015	0,069	-0,043	0,011	0,032
I médio		0,137	-0,122	0,061	0,022	-0,012	0,031	-0,008	0,009	-0,023	-0,083	-0,026	-0,162	0,004	-0,122
número de comparações		28,5 (1,00)	63,3 (2,36)	104,0 (5,35)	120,0 (5,72)	118,0 (6,68)	132,8 (5,91)	116,8 (6,80)	115,5 (6,24)	77,8 (2,63)	85,0 (6,78)	108,5 (8,70)	102,0 (9,63)	83,8 (3,40)	45,3 (4,57)

## 6. CORRELOGRAMAS

Figura 17: Correlogramas para os alelos individuais dos locos polimórficos analisados para a amostra de **indivíduos jovens** de *Aspidosperma polyneuron* na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.



**Figura 18:** Correlogramas para os alelos individuais dos 4 locos polimórficos analisados para a **População 1** de *Aspidosperma polyneuron* na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.



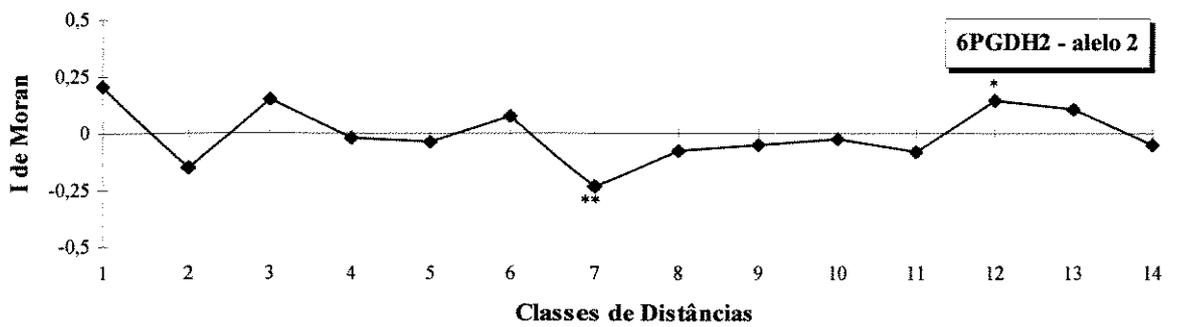
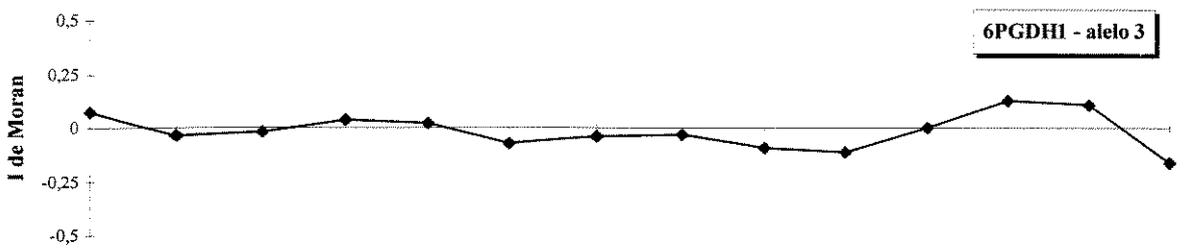
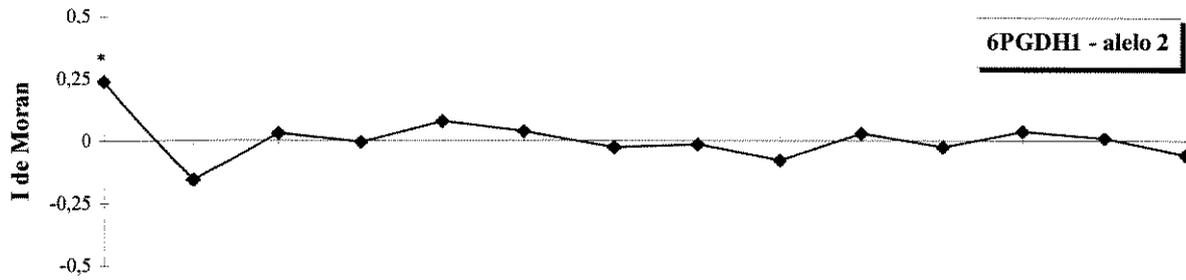


Figura 19: Correlogramas para os alelos individuais dos 4 locos polimórficos analisados para a **População 2** de *Aspidosperma polyneuron* na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália-SP. Campinas-SP, UNICAMP. 1997.

