



**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES
NATURAIS DE *Podocarpus sellowii* Klotzsch
(PODOCARPACEAE) NA REGIÃO DO ALTO
RIO GRANDE, SUL DE MINAS GERAIS**

FLÁVIO RODRIGUES GONÇALVES

2008

FLÁVIO RODRIGUES GONÇALVES

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
Podocarpus sellowii Klotzsch (Podocarpaceae) NA REGIÃO DO ALTO
RIO GRANDE, SUL DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 7 de maio de 2008.

Prof. Eduardo Leite Borba UFMG

Prof. Eduardo van den Berg UFLA

Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Gonçalves, Flávio Rodrigues.

Estrutura genética em populações naturais de *Podocarpus sellowii*
Klotzsch (Podocarpaceae) na região do Alto Rio Grande, Sul de Minas
Gerais / Flávio Rodrigues Gonçalves. -- Lavras : UFLA, 2008.

72 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Aloenzimas. 2. *Podocarpus*. 3. Gimnosperma. 4. Diversidade
genética. 5. Fluxo gênico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.97592

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida e permitir que mais uma etapa de minha vida fosse concluída.

Aos meus pais, João e Sirlene, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, me amando e dando exemplos de luta e sabedoria; ao meu irmão, Fernando, pela amizade, companheirismo e dedicação; a Glaucia, pelo amor, carinho, paciência e respeito; as minhas avós, “Cida” e “Fia”, pelas orações, e a meus tios e tias, primos e primas, pela confiança.

A minha orientadora, professora Dra. Dulcinéia de Carvalho, pelas sugestões neste trabalho, pela amizade e convivência, e pelos ensinamentos recebidos no decorrer do curso.

Aos professores membros da banca de defesa, pelas valiosas sugestões para este trabalho: Dr. Eduardo van den Berg e Dr. Eduardo Leite Borba.

Ao Anderson, por ter aberto as portas para o meu primeiro estágio no Laboratório de Melhoramento Florestal e Recursos Genéticos, que foi o primeiro passo para o ingresso na pós-graduação; ao Fábio, pela amizade e por ter contribuído em todas as etapas deste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório, Afrânio, Alison, Cristiane, Daniel, Danieli, Elias, Evânia, Gabriela, Hugo, Joema, Mírian e Renato; ao Murilo, Rogério e Alisson “Janu”, pela amizade, companheirismo e ajuda neste trabalho.

Aos amigos da Escola Superior em Meio Ambiente, em especial ao professor Dr. Francisco Antonio Pinto Colares “Xikuta”, e a estagiária Fabiana Carvalho.

Ao Departamento de Ciências Florestais e à Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de participar do programa de pós-graduação.

A todos os amigos e colegas do departamento, em especial para Evandro, Priscila, Hisaias e Sue Ellen, pela atenção e amizade; a Gleice, pela ajuda na confecção do desenho amostral.

Aos amigos de república, Celso, Manuel, Matheus, Pedro e Rodrigo, pela camaradagem e que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Ambientes ciliares.....	4
2.2 <i>Podocarpus sellowii</i> Klotzsch.....	5
2.3 Aloenzimas.....	7
2.4 Variabilidade genética.....	8
2.5 Estrutura genética.....	9
2.6 Fluxo gênico.....	10
2.7 Distribuição espacial dos genótipos.....	11
2.8 Tamanho efetivo populacional.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Área de estudo.....	15
3.2 Amostragem.....	18
3.3 Extração enzimática e eletroforese.....	18
3.4 Análise estatística dos dados.....	20
3.4.1 Frequências alélicas.....	20
3.4.2 Diversidade genética intrapopulacional.....	21
3.4.3 Estrutura genética.....	23
3.4.4 Fluxo gênico.....	24
3.4.5 Distribuição espacial dos genótipos.....	25
3.4.6 Tamanho efetivo populacional.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Sistemas aloenzimáticos.....	28
4.2 Frequências alélicas.....	30
4.3 Índices de variabilidade genética.....	33
4.4 Estrutura genética.....	36
4.5 Fluxo gênico.....	42
4.6 Distribuição espacial dos genótipos.....	45
4.7 Tamanho efetivo populacional.....	48
5 CONCLUSÕES.....	52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8 ANEXOS – Listas de tabelas e figuras.....	70

RESUMO

GONÇALVES, Flávio Rodrigues. **Estrutura genética em populações naturais de *Podocarpus sellowii* Klotzsch (Podocarpaceae) na região do Alto Rio Grande, Sul de Minas Gerais.** 2008. 72p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

No sul de Minas Gerais, grande parte dos ecossistemas ciliares encontra-se fragmentados e degradados, conseqüências das atividades humanas. Assim, estudos genéticos das populações que não sofreram estes efeitos são importantes para a conservação das espécies. Para caracterizar a variabilidade genética em populações de *P. sellowii* Klotzsch, espécie arbórea típica de mata de galeria em campo rupestre, foram estudados três locais, com altitude oscilando entre 935 a 1.055m, localizados no município de Itumirim, MG (S 21°21'42,8"; W 044°46'05,2"). Dez locos aloenzimáticos polimórficos foram utilizados para estimar as freqüências alélicas referentes a 232 indivíduos distribuídos em oito subpopulações divididas naturalmente por afloramentos rochosos. Os resultados indicaram alta variabilidade genética para a espécie em todas as subpopulações, com \hat{H}_o variando de 0,593 a 0,658 e \hat{H}_e variando de 0,484 a 0,502. Os dados da estrutura genética indicaram ausência de endogamia dentro ($\hat{f} = -0,292$) e para o conjunto das populações ($\hat{F} = -0,264$). A divergência genética para a espécie entre as subpopulações foi de 2,1%. O fluxo gênico ($\hat{N}m$) foi baixo entre subpopulações pertencentes a cursos d'água distintos e não suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética, corroborando a correlação positiva existente entre as matrizes de distância genética e geográfica ($r_m=0,496$, $P=0,022$). A estimativa do coeficiente de coancestria mostrou que apenas a população A possui uma distribuição agrupada dos genótipos até 94 m, sendo os das demais populações distribuídos aleatoriamente. A análise estatística S_p não apresentou estrutura genética espacial significativa nas populações. Em todas as subpopulações os valores dos tamanhos efetivos foram superiores ao número de indivíduos amostrados. Em nenhuma subpopulação foi constatado equilíbrio entre mutação e deriva, indicando ocorrência de gargalos populacionais recentes. Os dados apresentados são imprescindíveis para apontar quais são as estratégias mais efetivas a serem utilizadas para a conservação genética da espécie.

¹ Comitê Orientador: Dulcinéia de Carvalho - UFLA (Orientador); Eduardo van den Berg - UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

GONÇALVES, Flávio Rodrigues. **Genetic structures in natural populations of *Podocarpus sellowii* Klotzsch (Podocarpaceae) in Alto Rio Grande area South of Minas Gerais.** 2008. 72p. Dissertation (Master's degree in Forest Engineering) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

In the southern part of Minas Gerais State, great part of the ciliary ecosystems is fragmented and degraded, consequences of the human activities. Therefore, genetic studies of the populations that didn't suffer these effects are important for species conservation. To characterize the genetic variability in populations of *P. sellowii* Klotzsch, typical arboreal species of gallery forest in rupestrian area (area rupestre), three places were studied, with altitude varying from 935 to 1.055m, located in Itumirim county, MG (S 21°21'42,8"; W 044°46'05,2"). Ten polymorphic alloenzymatic loci were used to estimate the allelic frequencies of 232 individuals distributed in eight subpopulations divided naturally by rocky flooring. The results indicated high genetic variability for the species in all the subpopulations, with \hat{H}_o varying from 0,593 to 0,658 and \hat{H}_e varying from 0,484 to 0,502. The data of the genetic structure indicated endogamy absence both inside (= -0,292) and for the group of the populations (= -0,264). The genetic divergence for the species among the subpopulation was 2.1%. The genes flow ($\hat{N}m$) was low among subpopulations belonging to different water streams and not enough to cancel the existing effects of the genetic drift, corroborating the positive correlation among the matrices of genetic and geographical distance (rm=0,496, P=0,022). The estimate of the coancestry coefficient showed that only the population A possesses a contained distribution of the genotypes up to 94 m, being randomly distributed for the other populations. The statistical analysis Sp didn't present significant space genetic structure in the populations. In all the subpopulações, the values of the effective sizes were superior to the number of individuals sampled. In any subpopulation was verified balance among mutation and their flows, indicating occurrence of recent population bottleneck. The found data are indispensable to indicate, which are the most effective strategies to be used for the genetic species conservation.

¹ Guiding committee: Dulcinéia of Carvalho - UFLA (Advisor); Eduardo van den Berg - UFLA (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

A vegetação primitiva da região do Alto Rio Grande, no Sul do Estado de Minas Gerais, compreende um mosaico composto de manchas de floresta, cerrado, campo de altitude e campo rupestre (Eiten, 1982). Este último é um tipo de vegetação sobre topos de serras e chapadas de altitudes superiores a 900 m com afloramentos rochosos antigos, datadas do período pré-cambriano, onde predominam ervas e arbustos, inclusive arvoretas pouco desenvolvidas. A composição da flora em áreas de campo rupestre pode variar muito em poucos metros de distância e a densidade das espécies depende do substrato, da profundidade e fertilidade do solo, da disponibilidade de água e da posição topográfica. Nesta região, a topografia é acidentada e possui grandes blocos de rochas com pouco solo, geralmente raso, ácido e pobre em nutrientes orgânicos. Em geral, a disponibilidade de água no solo é restrita, pois as águas pluviais escoam rapidamente para os rios, devido à pouca profundidade e reduzida capacidade de retenção do solo. Ao longo dos cursos d'água há florestas ou galerias, contínuas ou interrompidas (Eiten, 1993). Nestas áreas é comum a presença de *Podocarpus sellowii* Klotzsch, sendo esta escolhida como modelo por se tratar de uma espécie de planta perene, gimnosperma, de distribuição geográfica descontínua e por apresentar um grande número de indivíduos dispostos uniformemente ao longo dos cursos d'água. Não existem relatos de diversidade genética em *P. sellowii*, sendo necessário conhecer os níveis de variabilidade e estruturação genética das populações e subpopulações em ambientes naturalmente fragmentados.

O grupo de pesquisa sobre genética de populações de espécies arbóreas da Universidade Federal de Lavras (www.dcf.ufla.br/conservacao) vem ao longo dos anos estudando algumas espécies arbóreas na região do Alto Rio Grande.

Nesta mesma área, a espécie arbórea *Xylopia emarginata* Mart. foi estudada por Jaeger (2004), apresentando elevada variabilidade genética entre as populações e subpopulações. Os afloramentos rochosos impediram o fluxo gênico por atuarem como barreira geográfica para a dispersão desta espécie. O comportamento ecológico e genético da *X. emarginata* levou ao estudo de *P. sellowii*, para entender se os padrões de diversidade e estrutura genética seriam semelhantes.

Neste contexto, avaliou-se a divergência genética neutra entre populações e subpopulações para auxiliar práticas de conservação *in situ*. As seguintes questões foram abordadas nesta dissertação: (i) quais os níveis de variabilidade genética entre populações e subpopulações localizadas em cursos d'água distintos? (ii) o fluxo gênico é suficiente para que as populações e subpopulações se mantenham coesivas? (iii) em populações naturalmente fragmentadas existe um padrão de isolamento pela distância? (iv) quais os níveis de estruturação genética entre populações ao longo da paisagem e dentro das populações e quais seriam as possíveis implicações para a conservação genética *in situ*?

Para responder a estas questões, este estudo caracterizou a diversidade genética de populações de *Podocarpus sellowii* Klotzsch na região do Alto Rio Grande, município de Itumirim, MG. Esta região abriga amostras significativas de genótipos em condições naturais e em alto grau de conservação. Especificamente buscou-se:

- i. caracterizar a estrutura genética de *Podocarpus sellowii* Klotzsch em oito subpopulações no Alto Rio Grande;
- ii. quantificar a variabilidade genética destas oito subpopulações de *Podocarpus sellowii* Klotzsch;
- iii. estimar o fluxo gênico entre as subpopulações;
- iv. estudar a distribuição espacial dos genótipos;

v. estimar o tamanho efetivo das populações.

O conhecimento de parâmetros genéticos desta espécie é importante para assinalar quais estratégias mais efetivas deverão ser adotadas em razão do acelerado processo de destruição e degradação das populações naturais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ambientes ciliares

As florestas ciliares, matas de galeria e ripárias, fornecem inúmeros benefícios ao ecossistema, exercendo função protetora dos recursos naturais bióticos e abióticos. Devido ao seu efeito tamponador, contribuem para a estabilidade do solo de áreas marginais, controlando processos erosivos, regulam os regimes hídricos, devido à sua influência no lençol freático, sustentam a fauna aquática e silvestre, mantendo a interação entre solo-água-planta-fauna (Lima, 1989; Silva et al., 1992; Pedralli & Teixeira, 1997), funcionam como corredores ecológicos que interligam diferentes unidades fitogeográficas e viabilizam o fluxo gênico entre populações fragmentadas de plantas (Kageyama, & Gandara, 2000). Para a fauna terrestre, os ecossistemas ripários servem como local de abrigo, reprodução, alimentação e fornecimento de água, principalmente em áreas de campos e cerrados, onde os recursos necessários para a sobrevivência da fauna são escassos (Passos, 1998).

Os termos Mata de Galeria e Mata Ciliar são utilizados com base na largura da faixa de floresta e fisionomia da vegetação de entorno. Porém, Ribeiro & Walter (1998) citam que na maioria das vezes, ambos são diferenciados pela composição florística e deciduidade. Para estes autores o termo Mata de Galeria é usado para a vegetação que corresponde a uma formação mesofítica, com algum grau de caducifolia, que se encontra em um ou em ambos os lados do curso d'água e cuja vegetação original não seja uma floresta contínua (cerrado, campinas, caatinga, campos, etc.). Já para Kawaguici (2001), o termo mata de galeria é designado para a vegetação florestal ocorrente em cursos d'água de pequena largura, onde as copas das árvores de ambas as margens se tocam, formando uma galeria propriamente dita, permitindo um

ambiente característico para a população. Ribeiro & Walter (1998), designam, a vegetação estreita, limitada à beira dos diques marginais dos rios, em geral mais estreita que a floresta de galeria e, com certa deciduidade, mata ciliar.

2.2 *Podocarpus sellowii* Klotzsch

O gênero *Podocarpus*, representado por mais de 100 espécies, muitas das quais de grande interesse florestal, enquadra-se como grupo sistemático cosmopolita, pois apresenta ampla distribuição geográfica mundial. *Podocarpus sellowii* Klotzsch (Figura 1) é uma Gymnospermae, ordem Coniferales e família Podocarpaceae (Duarte, 1973; Joly, 1991), conhecido vulgarmente como pinho-bravo e louro-pinho. As gimnospermas arbóreas, segundo Maixner & Ferreira (1976), são representadas no Brasil por apenas dois gêneros: *Araucaria*, com uma única espécie, a *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., e *Podocarpus*, englobando duas espécies, *Podocarpus lambertii* Klotzsch. e *Podocarpus sellowii* Klotzsch. Além destas duas espécies de *Podocarpus* endêmicas do Brasil, Mainieri & Pires (1973) citam que há mais quatro espécies de *Podocarpus* geograficamente distribuídas nas fronteiras da Amazônia com as Guianas e a Venezuela. São elas: *Podocarpus magnifolius* Buchh., *Podocarpus roraimae* Pilg., *Podocarpus steyermarkii* Buchh. e *Podocarpus tepuiensis* Buchh.

Apesar da ampla distribuição geográfica no Brasil, o gênero *Podocarpus* apresenta distribuição ecológica restrita, que o condiciona a ocupar o espaço geográfico de forma descontínua, sendo portanto, encontrado em áreas cujas altitudes variam de 400 a 1800 m, com características edafoclimáticas especiais, tais como: solos leves, silicosos, húmidos, bem arejados sob condições de baixa temperatura e umidade ambiental elevada. Dessa forma, considerando a ocupação territorial das duas espécies endêmicas, o *P. lambertii* predomina nas áreas de clima mais frio, restringindo-se, portanto, às áreas serranas das regiões meridionais do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo,

Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais); enquanto *P. sellowii* apresenta maior abrangência, ocorrendo tanto nas áreas frias das regiões meridionais como nas quentes, expandindo-se em regiões mais setentrionais do país, mais particularmente no Nordeste: Sergipe, Pernambuco, Paraíba e Ceará (Andrade-Lima, 1966; Duarte, 1973; Mainieri & Pires, 1973; Veloso & Góes-Filho, 1982; Figueiredo et al., 1990).



FIGURA 1 *Podocarpus sellowii* Klotzsch

As síndromes de polinização e dispersão dessa espécie não são bem conhecidas. A espécie produz grande quantidade de diásporos e apresenta um pedúnculo com porção terminal suculenta de cor vináceo-escura e de sabor adocicado quando maduro. Por apresentar essas características, acredita-se que são dispersos por animais (zoocoria), principalmente por aves (ornitocoria), pela água (hidrocoria) e pela gravidade (barocoria).

Apesar de sua madeira não se destacar economicamente, *P. sellowii* apresenta uma utilização ampla: confecções de compensados, brinquedos,

palitos de fósforo, caixotaria, forros, carpintaria, lápis, entre outros. Entretanto, Mainieri & Pires (1973) ressaltam que, do ponto de vista econômico, a madeira de *Podocarpus* pouco se sobressai, devido ao pouco conhecimento geral da espécie. Porém, suas características e aplicações se assemelham às do pinheiro-brasileiro, *Araucaria angustifolia*. Por ser uma espécie ornamental, pode ser empregada também no paisagismo. Outra possibilidade de utilização é a produção de mudas destinadas à recuperação de áreas degradadas, sobretudo as que se enquadram como áreas de preservação permanente.

2.3 Aloenzimas

O termo isoenzima foi proposto por Markert & Moller (1959), e refere-se a formas diferentes de uma mesma enzima que ocorrem num mesmo organismo com afinidade por um mesmo substrato (funções idênticas ou similares). As isoenzimas são controladas geneticamente por um ou vários genes, situados num mesmo loco ou em locos diferentes, respectivamente (Scandalios, 1969). Segundo a “Enzyme Commission for the International Union of Biochemistry” (1976), o termo “isoenzima” deveria ser limitado às formas diferentes que surgissem por modificações da estrutura primária das proteínas e o termo “formas múltiplas” seria mais abrangente, incluindo todas as formas moleculares de uma proteína com a mesma atividade enzimática. Um outro termo – “aloenzima” – foi criado para designar as proteínas variantes, produzidas por diferentes alelos de um mesmo loco (Gottlieb, 1971).

De forma mais elucidativa poderemos diferenciar o termo isoenzima de aloenzima da seguinte maneira: ao colocar um corante específico em um substrato onde ocorreu uma corrida eletroforética, observa-se que surge um número “n” de bandas denominadas isoenzimas. Quando algumas destas bandas são identificadas como produtos de diferentes alelos de um mesmo loco, passam

a ser chamadas de aloenzimas. Portanto, este termo seria o mais correto em estudos de genética de populações.

Os marcadores aloenzimáticos complementam os métodos tradicionalmente empregados no melhoramento, no manejo e na conservação de espécies florestais (Alfenas et al., 1998). Este tipo de marcador tem sido muito utilizado em estudos que envolvem a caracterização genética de populações naturais de espécies vegetais (Borba et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Botrel & Carvalho, 2004; Melo Júnior et al., 2004; Pinto & Carvalho, 2004; Pinto et al., 2004; Gonzales & Hamrick, 2005; Gusson et al., 2005; Luna et al., 2005; Vieira, 2005; Lambert et al., 2006; Souza, 2006; Pereira et al., 2007; Ribeiro et al., 2007).

2.4 Variabilidade genética

A variabilidade genética é uma condição fundamental para que haja evolução, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações em função da adaptação ao ambiente, convergindo para a variação entre populações e, finalmente, para a variação entre espécies (Torggler et al., 1995). A manutenção da variabilidade genética em populações é a base da conservação de espécies (Yeeh et al., 1996) e por isso seu conhecimento e entendimento são fundamentais. Segundo Kageyama & Gandara (1993), esse entendimento é a base para a aplicação de técnicas de manejo nas florestas tropicais, além de contribuir para o estabelecimento da conservação *in situ* de populações naturais. Frankel et al. (1996) relatam que conhecer os padrões de distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações naturais garante o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas e eficientes.

Entretanto, a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações está relacionada com alguns fatores intrínsecos à espécie como o mecanismo de dispersão de pólen e sementes, o modo de reprodução, o sistema

de cruzamento, bem como alguns fatores ambientais que possam influenciar ou direcionar de forma agregada essa distribuição (Kevin et al., 2004; Marquardt & Epperson, 2004; Luna et al., 2005).

2.5 Estrutura genética

Estrutura genética é a forma pela qual a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie (Brown, 1978). Para Hamrick (1982) o desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética ocorrem devido às interações de um conjunto complexo de fatores evolutivos, com variação no conjunto gênico, organização desta variação dentro de genótipos, distribuição espacial dos genótipos, sistema de reprodução que controla a união dos gametas para a formação das progênes, seleção, deriva, mutação, eventos casuais e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem às populações futuras.

Os estudos de estrutura genética são fundamentados no teorema de Hardy-Weinberg. Segundo este princípio, em uma população de tamanho infinito, com cruzamentos ao acaso, as frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes de geração para geração na ausência de migração, seleção e deriva. Este princípio permite o cálculo teórico da frequência de um determinado genótipo, independente do número de alelos existente (Futuyma, 1992).

Para se caracterizar a estrutura genética populacional, a partir de marcadores codominantes, como no caso aloenzimas, os métodos estatísticos geralmente empregados são as análises de variância de frequências gênicas (Cockerhan, 1969; Vencovsky, 1992; Weir, 1996), a diversidade genética de Nei (Nei, 1973) e as estatísticas F de Wright (1965).

2.6 Fluxo gênico

Fatores como o tamanho pequeno de uma população e a endogamia reduzem a variabilidade genética dentro da população via deriva genética, contribuindo para o desenvolvimento de uma heterogeneidade genética entre populações. Segundo Hartl & Clark (1997), a importância do fluxo gênico está justamente em contrapor os efeitos da deriva genética, permitindo a homogeneização das frequências alélicas. Para Slatkin (1985), fluxo gênico é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra. Neigel (1997) define fluxo gênico como o movimento de genes em populações incluindo todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente trocam genes na distribuição espacial. O fluxo gênico é estimado a partir das medidas de divergência genética entre as populações.

Quando um ou mais indivíduos migram por geração, os efeitos da migração são suficientes para contrapor os efeitos da deriva e, portanto, o número de migrantes por geração impede a divergência entre populações (Wright, 1951). Diversos são os fatores que podem afetar o fluxo de genes nas populações naturais, como o sistema reprodutivo da espécie e as relações ecológicas entre as plantas e seus polinizadores e dispersores (Dick et al., 2003; Rocha & Aguilar, 2001).

Futuyma (1992) descreve quatro modelos para explicar como o fluxo gênico atua em metapopulações: i) continente-ilha, ii) ilhas, iii) alpondras ("stepping-stone") e iv) modelo de isolamento por distância.

- a) Modelo continente-ilha, no qual existe um movimento unidirecional de uma população grande continental para uma população menor isolada (Wright, 1940).
- b) Modelo de ilha, no qual a migração ocorre ao acaso entre grupos de pequenas populações (Wright, 1951).

- c) Modelo de alpondras (ou *stepping-stone*), no qual cada população recebe migrantes somente de populações vizinhas (Kimura & Weiss, 1964).
- d) Modelo de isolamento pela distância, no qual o fluxo gênico ocorre localmente entre vizinhos, em uma população de distribuição contínua (Wright, 1943).

Para a quantificação do fluxo gênico pode-se utilizar medidas diretas e indiretas. As medidas diretas referem-se ao fluxo gênico contemporâneo e são baseadas em observações do movimento dos vetores de pólen e sementes (Latta et al., 1998) e na análise da paternidade (Jones & Ardren, 2003), enquanto que as indiretas referem-se ao fluxo gênico histórico (ou passado) e são baseadas na distribuição da estrutura e diversidade genética entre populações (Neigel, 1997; Sork et al., 1999; Smouse & Sork, 2004).

2.7 Distribuição espacial dos genótipos

Para Brown (1979), o estudo dos padrões espaciais dos indivíduos em uma população natural de plantas é uma das ferramentas mais utilizadas para a compreensão do comportamento dos processos evolutivos e ecológicos. O conhecimento dos padrões espaciais fornece informações que intensificam ainda mais as técnicas de manejo e conservação e também auxiliam nos processos de amostragem, uma vez que consideram as interações existentes entre os indivíduos e o ambiente físico e biológico (Anjos, 1998). O conhecimento sobre a estrutura espacial genética também é importante para populações de plantas que são selecionadas para conservação ou coletadas para uso em programas de melhoramento. Isto deve ser considerado a fim de estabelecerem-se estratégias de amostragem de populações naturais, conseguindo-se, assim, maximizar a diversidade populacional ou da espécie. A aplicação deste conhecimento

também tem o efeito de minimizar o impacto de práticas de manejo sustentáveis dos recursos genéticos (Shapcott, 1995; Myamoto et al., 2002; Ng et al., 2004).

O padrão espacial de uma espécie caracteriza a forma como os indivíduos estão distribuídos na área, sendo uma das características da estrutura populacional. Segundo Kevin et al. (2004), diversos processos evolutivos e ecológicos, como a dispersão de sementes, a competição inter e intraespecífica e a heterogeneidade do ambiente podem afetar os padrões de distribuição espacial dos indivíduos dentro de uma população. Em adição aos processos ecológicos e evolutivos, a estrutura genética espacial dentro das populações também pode afetar os padrões de distribuição espacial, pela dispersão limitada de pólen e sementes, deriva genética local, endogamia e seleção, favorecendo o mesmo ou diferentes genótipos (Heywood, 1991; Epperson, 1995). Como implicações genéticas, as alterações na estrutura espacial dos indivíduos de uma população podem afetar, por exemplo, a taxa de cruzamento (Epperson & Allard, 1989) mediante mudanças na densidade e no comportamento dos polinizadores, gerando alterações nos níveis de cruzamento, como o aumento da autofecundação e, conseqüentemente, da endogamia (Bawa & Krugman, 1990; Murawski, 1995; Franceschinelli & Bawa, 2000).

Medidas simples de variação como número de alelos por loco e as frequências têm sido usadas como parâmetros quantitativos para descrever a estrutura genética, considerando premissas evolutivas em um contexto espacial (Weir & Cockerham, 1984; Loiselle et al., 1995; Hardy & Vekemans, 1999; Epperson, 2000; Vekemans & Hardy, 2004). Para Wright (1965), a similaridade genética é maior entre vizinhos do que entre indivíduos geograficamente distantes. Espera-se que o padrão de estrutura genética seja resultado do balanço entre o efeito da deriva genética e da dispersão gênica em uma população contínua.

Estudos realizados com marcadores moleculares codominantes neutros mostram moderada e elevada estruturação genética interpopulacional (Borba et al., 2001; Jesus et al., 2001; Machado, 2005; Azevedo et al., 2007; Pereira et al., 2007).

2.8 Tamanho efetivo populacional

A diminuição do tamanho efetivo da população (\hat{N}_e) é um dos principais fatores responsáveis pela perda de variabilidade em populações ameaçadas de extinção (Solé-Cava, 2001). Essa medida refere-se ao grau de representatividade genética presente em uma amostra de plantas, sementes ou propágulos (Sebbenn, 2001). Para Wright (1931), o tamanho ideal de uma população é aquela na qual cada indivíduo contribui igualmente para o conjunto gamético, tendo a mesma variação em frequências alélicas que a população observada. Em outras palavras é o número de indivíduos que efetivamente participam na reprodução e que contribuem para a geração seguinte.

O número mínimo de indivíduos que se reproduziram durante um período do estrangulamento demográfico (bottleneck) define a probabilidade de perda de alelos por deriva genética. Os alelos perdidos só podem ser recuperados por mutação ou, a partir de outras populações, por imigração (Solé-Cava, 2001).

O tamanho efetivo de população influencia diretamente na manutenção da estrutura genética de uma população ao longo das gerações. Nesse sentido, o \hat{N}_e é de grande importância para calcular a população mínima viável, importante para estratégias de conservação *in situ* de uma espécie. Além disso, o conhecimento do \hat{N}_e pode contemplar também os planos de conservação *ex situ*, pois a coleta de sementes para coleções de germoplasma pode ser feita de maneira a se capturar o máximo de representatividade genética, ou seja, o

máximo \hat{N}_e e, a partir desse parâmetro, propiciar a manutenção das populações por longo tempo nos bancos de germoplasma (Sebbenn, 2001).

Frankel & Soulé (1981) sugerem dois números de referência para o tamanho efetivo. Um \hat{N}_e de 50 seria suficiente para conter os efeitos da endogamia nas populações, considerando 10 gerações, enquanto que um \hat{N}_e de 500 considera ainda que a estocasticidade genética possa estar implicada na perda a longo prazo da flexibilidade evolutiva e, por isso, este número seria suficiente para conter a perda de variação genética na mesma. Entretanto, esses valores têm sido criticados na literatura (Sebbenn, 2003), e outros tamanhos têm sido sugeridos. Nunney & Campbell (1993) sugerem multiplicar os tamanhos efetivos de 50 e 500, determinados por Frankel & Soulé (1981), por duas a três vezes, o que corresponde ao tamanho efetivo de 100 a 150, para conservação em curto prazo, e de 1.000 a 1.500, para conservação em longo prazo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A área de estudo caracteriza-se por matas de galeria que apresentam limites bem definidos com uma formação não florestal (campo rupestre), com altitude média de 1.000 m. A região em questão está localizada a 14 km da sede do município de Itumirim-MG, sentido Carrancas e, em toda a região, é conhecida como Cachoeira das Aranhas, e tem como referência as coordenadas S 21°21'42,8" e W 044°46'05,2" (Figura 2).

Oito subpopulações de *P. sellowii* Klotzsch. foram amostradas em três diferentes cursos d'água. As subpopulações foram caracterizadas devido à interrupção natural das formações florestais ao longo do curso d'água por afloramentos rochosos, característicos do local. As subpopulações de um mesmo curso d'água formam uma população, ficando assim definidas: subpopulações A1, A2, A3 e A4 pertencentes ao Córrego Batatal, população A; subpopulações B1 e B2 pertencentes ao Córrego Farias, população B; e subpopulações C1 e C2 pertencentes ao Córrego Morro da Janela, população C (Figura 2). As distâncias entre subpopulações variaram entre 206 e 2228 metros (Tabela 1). É importante ressaltar que os córregos pertencem a microbacias adjacentes, que são delimitadas por divisores de águas. Estes divisores acentuam-se ao longo das microbacias, formando barreiras naturais. A declividade dos córregos diminui a medida que a altitude se eleva, chegando a ser nula no topo, e nas partes mais baixas a declividade é tamanha que forma barreiras naturais como cachoeiras.

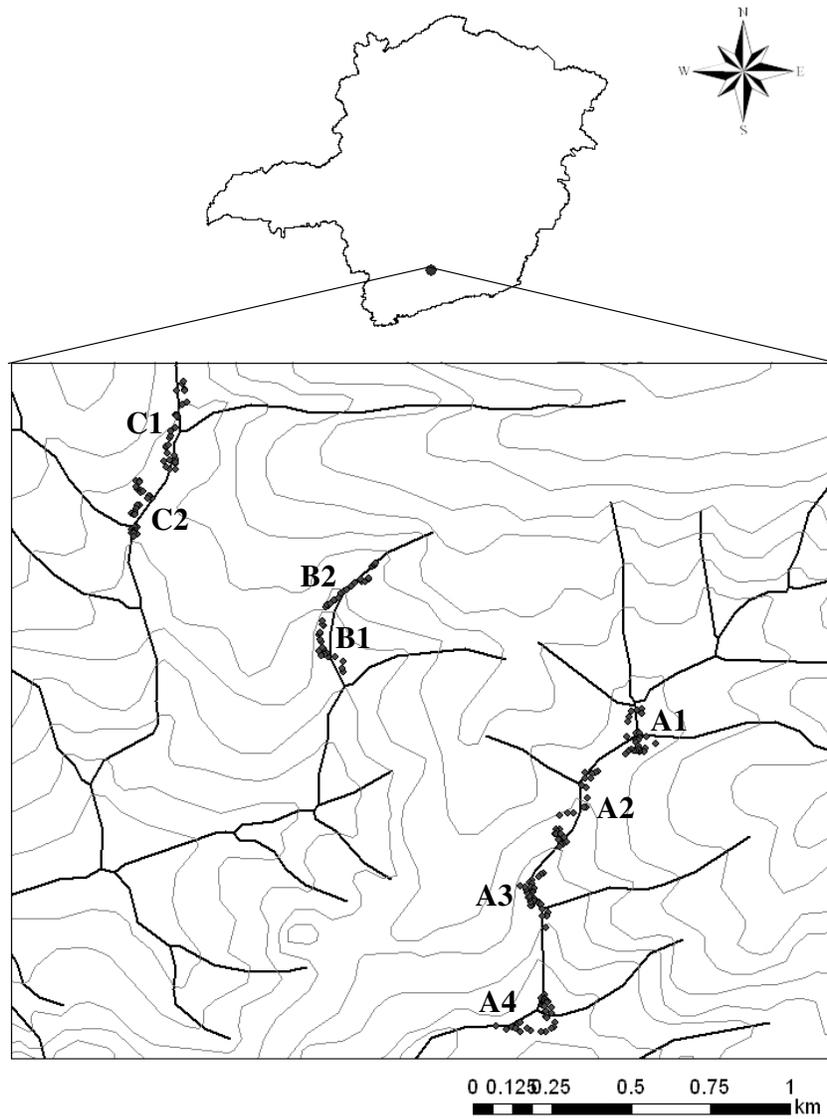


FIGURA 2 Localização e caracterização das subpopulações da área experimental para *Podocarpus sellowii* Klotzsch.

TABELA 1 Altitude e distância geográfica em metros entre as oito subpopulações de *Podocarpus sellowii* Klotzsch. analisadas.

Subpopulações	Altitude (m)	A1	A2	A3	A4	B1	B2	C1	C2
A1	1030	-	327	634	989	1046	1035	1754	1741
A2	1010		-	311	695	954	1008	1750	1638
A3	990			-	409	1037	1144	1870	1759
A4	935				-	1391	1522	2228	2088
B1	1015					-	206	837	731
B2	1045						-	742	708
C1	1055							-	285
C2	1040								-



Figura 3 Imagens dos locais deste estudo. A – Mata de Galeria, subpopulação A2; B – Término da subpopulação A3 perante barreira geográfica “cachoeira”; C – Subpopulação A4; D – Afloramento rochoso entre as subpopulações A3 e A4.

3.2 Amostragem

As árvores adultas foram amostradas de forma aleatória ao longo de toda a extensão das subpopulações. Tanto indivíduos agrupados como isolados foram coletados. Os indivíduos amostrados foram identificados e georeferenciados, utilizando-se o Sistema de Posicionamento Global (GPS). A estrutura genética de *P. sellowii* foi estudada com amostras de 232 indivíduos no total (Tabela 2), procurando-se coletar no mínimo 30 árvores por subpopulação, sendo que nas subpopulações B1 e B2 foi amostrado um número menor, devido à baixa ocorrência local.

TABELA 2 Tamanho amostral (N) para as subpopulações de *Podocarpus sellowii* (Klotz.).

	Subpopulações							
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	C1	C2
N	30	33	32	32	21	24	30	30

Amostras foliares de cada indivíduo foram coletadas, embaladas, identificadas e acondicionadas em caixa térmica com gelo para o transporte. No Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas (Departamento de Ciências Florestais – Universidade Federal de Lavras), o material vegetal foi armazenado em freezer -80°C, até o momento da extração.

3.3 Extração enzimática e eletroforese

Para a extração das enzimas foram usados 300 mg de tecido foliar, PVP e 1,5 mL de solução tampão nº1 de Alfenas et al. (1998). As folhas foram maceradas manualmente mediante uso de almofariz e pistilo de porcelana previamente resfriados. Após a maceração, as amostras contendo o extrato protéico foram transferidas para tubos de 1,5 mL e armazenadas a -80 até o momento das análises eletroforéticas.

A eletroforese foi conduzida em cuba vertical, utilizando-se géis de poliacrilamida como suporte. As concentrações dos géis de separação e concentração foram respectivamente 10% e 4%. Os extratos protéicos obtidos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, 30 µL do sobrenadante foram aplicados nas canaletas dos géis para proceder as corridas eletroforéticas. Para a eletroforese foi utilizada amperagem de 10 mA por gel, 300 Volts. A corrida eletroforética teve duração aproximada de 3 horas e 30 minutos, sendo realizada à temperatura de 4°C. Os procedimentos de preparo do gel, a aplicação das amostras e a eletroforese seguiram a metodologia descrita por Alfenas et al. (1998).

Foram testados 15 sistemas enzimáticos (Tabela 3) comumente descritos na literatura.

TABELA 3 Sistemas enzimáticos testados em *Podocarpus sellowii* (Klotz.).

Sistema enzimático	Sigla	EC*
Álcool desidrogenase	ADH	1.01.01.01
α-esterase	α-EST	3.01.01.01
Enzima málica	ME	1.01.01.40
Fosfatase ácida	ACP	3.01.03.02
Fosfoglucomutase	PGM	5.04.02.02
Glucose desidrogenase	GDH	1.01.01.47
β-galactose desidrogenase	GLDH	1.01.01.48
Glucose-6-fosfato desidrogenase	G6PDH	1.01.01.49
Glutamato desidrogenase	GTDH	1.04.01.03
Glutamato oxaloacetato trasaminase	GOT	2.06.01.01
Isocitrato desidrogenase	IDH	1.01.01.42
Malato desidrogenase	MDH	1.01.01.37
Peroxidase	PO	1.11.01.07
Sorbitol desidrogenase	SDH	1.01.01.14
Xiquimato desidrogenase	SKDH	1.01.01.25

* *Enzyme Commission*

As revelações dos géis foram baseadas na metodologia descrita por Alfenas et al. (1998). Detalhes sobre cada uma das enzimas, bem como as soluções e metodologia para revelação podem ser obtidos em Brune et al.

(1998). Após o aparecimento das bandas, os géis foram retirados da solução de revelação, lavados em água corrente e interpretados. Após a interpretação os géis foram descartados e alguns foram fotografados. A identificação das zonas codificadoras dos locos e dos alelos foi feita a partir da região mais anódica para a mais catódica. Assim, em um sistema enzimático em que duas zonas de atividade eram claramente identificadas, a de maior migração no gel recebeu a denominação de loco-1 e a outra, loco-2. Da mesma forma procedeu-se em relação aos alelos de cada loco. A interpretação de cada sistema enzimático foi realizada seguindo os padrões descritos por Alfenas et al. (1991), Kephart (1990) e Soltis & Soltis (1989).

3.4 Análise estatística dos dados

Após a interpretação dos zimogramas as frequências alélicas em cada loco foram obtidas. A partir dessas frequências, estimaram-se os índices de diversidade, porcentagem de locos polimórficos, número de alelos por loco, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada segundo as expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.4.1 Frequências alélicas

As frequências alélicas descrevem a variação para um loco e foram obtidas pela contagem direta do número de alelos por loco dividido pelo número total de alelos no loco: $\hat{p}_{ij} = n_{ij}/n_{.j}$ sendo \hat{p}_{ij} a frequência do alelo i na população j ; n_{ij} o número de ocorrência do alelo i na população j e $n_{.j}$ o número total de alelos amostrados na população j .

3.4.2 Diversidade genética intrapopulacional

A partir das frequências alélicas avaliou-se a natureza da variabilidade genética. Foram obtidos os índices de diversidade, tais como: porcentagem de

locos polimórficos (\hat{P}), número médio de alelos por loco (\hat{A}), heterozigidade média observada (\hat{H}_o) e heterozigidade média esperada (\hat{H}_e) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As estimativas foram obtidas a partir do programa BIOSYS 2, (Swofford & Selander, 1997). O programa estima esses parâmetros da seguinte forma:

a) Porcentagem de locos polimórficos (\hat{P})

Um loco foi considerado polimórfico quando a frequência de seu alelo mais comum não ultrapassou 0,95, conforme sugerido por Nei (1987), para amostras inferiores a 50 indivíduos. Desta forma, o \hat{P} foi obtido pela divisão do número de locos polimórficos pelo número total de locos analisados. $\hat{P} =$ número de locos polimórficos / número total de locos analisados.

b) Número médio de alelos por loco (\hat{A})

O \hat{A} fornece uma idéia da distribuição dos alelos nas diferentes populações analisadas. O número médio de alelos por loco em cada população foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número de total de locos. $\hat{A} =$ n° de alelos na população/ n° total de locos.

c) Heterozigidade média observada (\hat{H}_o);

A heterozigidade observada para cada loco foi obtida pela expressão: $\hat{H}_o = 1 - \sum P_{ii}$ em que P_{ii} é a frequência dos genótipos homozigotos.

Para se obter a heterozigidade média observada, os valores obtidos para cada loco foram somados e divididos pelo número total de locos.

d) Heterozigidade média esperada (\hat{H}_e);

A heterozigidade para cada loco foi obtida a partir das frequências alélicas, segundo as expectativas de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo

com Nei (1987): $\hat{H}_e = 2n(\sum \hat{P}_i^2)/(2n - 1)$ em que: n é o nº de indivíduos amostrados na população em questão e \hat{P}_i^2 a frequência alélica estimada do i -ésimo alelo.

A heterozigosidade média esperada foi obtida pela média aritmética entre todos os locos analisados (tanto monomórficos como polimórficos).

O coeficiente F de Wright (1931) foi obtido por loco e pela média dos locos, a partir das seguintes relações:

$$\begin{array}{ll} \hat{f} = 1 - \hat{H}_o/\hat{H}_e & \hat{f} = 1 - \sum \hat{H}_o/\sum \hat{H}_e \\ \text{(loco)} & \text{(média dos locos)} \end{array}$$

em que:

\hat{f} = estimativa do índice de fixação de Wright;

\hat{H}_o = estimativa da heterozigosidade observada;

\hat{H}_e = estimativa da heterozigosidade esperada;

Para as estimativas obtidas dos índices de fixação médios considerando cada população, foram estabelecidos intervalos de confiança a 95% de probabilidade utilizando-se o procedimento de *bootstrap* com 10.000 repetições (Weir, 1996). As análises dos índices de fixação médios foram realizados com o auxílio do programa GDA (*Genetic Data Analysis*) (Lewis & Zaykin, 2000).

3.4.3 Estrutura genética

O estudo de estrutura genética entre e dentro de populações foi abordada a partir dos coeficientes de coancestralidade de Cockerham (Cockerham, 1969; Vencovsky, 1992). Esta metodologia foi empregada porque permite a avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia, além de calcular as estimativas com correção para tamanho populacional finito. Os coeficientes de

coancestralidade foram obtidos a partir da decomposição dos componentes de variação da análise de variância das frequências alélicas, conforme Cockerham (1969).

Os parâmetros estimados foram:

- $\hat{\theta}_p$, que é a divergência genética entre populações;
- \hat{F} , o índice de fixação para o conjunto das populações e
- \hat{f} , o índice de fixação para a média das populações.

O intervalo de confiança foi estimado com 95% de probabilidade, pelo método de reamostragem *bootstrap*, utilizando-se 10.000 repetições sobre locos, para verificar se estas estimativas médias eram diferentes de zero. As análises de variâncias e os *bootstrap* foram efetuados com o auxílio do programa GDA. Adicionalmente foi calculada a divergência genética (\hat{F}_{ST}) entre os pares de subpopulações, com o auxílio do programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

A identidade genética de Nei (1978) foi utilizada como medida de identidade genética entre os pares de populações. Mediante as estimativas de identidade genética foram construídos dendrogramas, utilizando-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average* ou Agrupamento não-ponderado aos pares utilizando médias aritméticas), de acordo com a metodologia descrita por Sneath & Sokal (1973). As consistências dos nós dos agrupamentos foram avaliadas pelo programa TFPGA 1.3 (*Tools for population genetic analysis*) (Miller, 1997). A análise de identidade genética multivariada (UPGMA) foi realizada utilizando o pacote NTSYS 1.5 (*Numerical taxonomy and multivariate analysis system*) (Rohlf, 1993).

Utilizando-se o teste exato de Fisher, os desvios das frequências genotípicas obtidas em relação às frequências esperadas pelas proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram estimados e testados, com o auxílio do programa BIOSYS 2 (Swofford & Selander, 1997). Para Weir (1996), os testes

exatos são geralmente usados para tamanhos amostrais pequenos, quando há uma maior chance de ter números esperados pequenos no teste qui-quadrado. Mesmo quando se trabalha com amostras grandes, a existência de três alelos raros no loco resulta em números esperados pequenos e, nesses casos, os testes exatos são preferíveis.

3.4.4 Fluxo gênico

As estimativas de fluxo gênico entre as populações basearam-se na metodologia proposta por Wright (1951), que considera a quantidade de migrantes (\hat{Nm}) e a divergência genética entre populações (\hat{F}_{ST}), e vem sendo comumente utilizado em genética de populações. Essas estimativas foram obtidas segundo a equação proposta por Crow & Aoki (1984), para um modelo de ilhas, segundo a qual:

$$\hat{Nm} = \frac{1}{4\alpha} \left(\frac{1}{\hat{F}_{ST}} - 1 \right)$$

sendo:

$$\alpha = (n/(n-1))^2$$

em que:

n = número de populações;

\hat{Nm} = número de migrantes;

Complementarmente, a matriz de distância genética (\hat{F}_{ST}) foi comparada com a matriz de distância geográfica pelo teste de Mantel (Manly, 1997). O valor Z de Mantel é dado por:

$$Z = n \sum_{i,j=1} X_{ij} Y_{ij},$$

sendo:

X_{ij} e Y_{ij} elementos das matrizes X e Y a serem comparadas, no caso, as matrizes de distância geográfica e genética, respectivamente;

O teste de Mantel foi realizado com o auxílio do programa PCOrd 4 (McCune & Mefford, 1999), utilizando-se 1.000 permutações aleatórias para testar a significância das correlações matriciais.

3.4.5 Distribuição espacial dos genótipos

Para a análise da estrutura espacial de *P. sellowii*, utilizou-se a estatística Sp (Vekemans & Hardy, 2004), e estimou-se o coeficiente de coancestria ($\hat{F}_{(ij)}$) com base em Loiselle et al. (1995) entre plantas para cada uma das classes de distância, utilizando-se o programa SPAGeDi 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002). Através da reamostragem *jackknife* o erro padrão da média das estimativas entre locos foi obtido e, a partir dele, foram construídos intervalos de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente de coancestria médio estimado para cada classe de distância. A ausência de estrutura genética espacial foi testada dentro de cada classe de distância, utilizando-se 1.000 permutações. A estatística Sp foi calculada por:

$$Sp = b_F / (\hat{F}_{(1)} - 1)$$

sendo:

$\hat{F}_{(1)}$ = média do coeficiente de coancestralidade (Loiselle et al., 1995) entre os indivíduos na primeira classe de distância;

b_F = inclinação da curva de regressão do coeficiente $\hat{F}_{(r)}$ contra o logaritmo da distância. Quando $b_F = 0$, aceita-se a hipótese nula de estrutura genética espacial aleatória;

Segundo Vekemans & Hardy (2004), quando a estrutura genética espacial é representativa do padrão de isolamento por distância em equilíbrio de dispersão e deriva, os parâmetros de dispersão gênica podem ser estimados a partir da estatística S_p , assumindo que a estrutura genética espacial resulta da dispersão isotrópica limitada de genes e atingiu uma fase estacionária.

3.4.6 Tamanho efetivo populacional

O tamanho efetivo pode ser estimado para várias situações, como para uma população de plantas adultas, uma população estruturada em progênies, várias populações, acessos de um banco de germoplasma, entre outras (Sebbenn, 2001). As estimativas de tamanho efetivo foram obtidas com base em Vencovsky (1997). Para o caso de uma única população, com ausência de estruturação genética, o tamanho efetivo de população foi calculado por:

$$\hat{N}_e = n / (1 + \hat{f}),$$

onde:

n = número de plantas adultas;

\hat{f} = coeficiente de endogamia intrapopulacional;

Para o caso de indivíduos de várias populações, em um modelo de infinitas populações (sem correção para tamanho finito de populações), tem-se que:

$$\hat{N}_e = 0,5/\hat{\theta}_p (1+C_p/p - 1/n) + 1+ \hat{F} /2n$$

onde:

$\hat{\theta}_p$ = coeficiente de coancestralidade relativo a populações;

p = número de populações avaliadas;

n = número total de indivíduos avaliados nas populações;

C_p = quadrado do coeficiente de variação do número de indivíduos (n_i) entre as populações;

\hat{F} = índice de fixação para o conjunto das populações;

Adicionalmente, desvios significativos do equilíbrio de mutação e deriva (efeitos de gargalo, por exemplo) devem ser detectados e têm sido analisados no estudo de genética de populações (Bacles et al., 2004; van Rossum & Prentice, 2004; Ramakrishnan et al., 2005; Vieira, 2005). Utilizou-se o programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996) para testar se as populações estão em equilíbrio entre mutação e deriva genética, conforme metodologia descrita em Cornuet & Luikart (1996). Segundo Luikart et al. (1998), populações que passaram por um recente processo de *bottleneck* apresentam um excesso temporário de heterozigiosidade. Isso faz com que \hat{H}_e se torne maior do que a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva (\hat{H}_{eq}), pois esta é calculada a partir do número de alelos (Cornuet & Luikart, 1996; Piry et al., 1999).

A significância foi avaliada com o uso do teste *signed rank* de Wilcoxon, por ser o mais robusto quando utilizado para menos de 20 locos (Piry et al., 1999), baseando-se em 5.000 replicações.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistemas aloenzimáticos

Noves dos 15 sistemas aloenzimáticos testados para *P. sellowii* foram selecionados em função da resolução do padrão de bandas dos locos: α -esterase (α -EST), fosfoglucomutase (PGM), glucose desidrogenase (GDH), β -galactose desidrogenase (GLDH), glutamato desidrogenase (GTDH), malato desidrogenase (MDH), peroxidase (PO), sorbitol desidrogenase (SDH) e xiquimato desidrogenase (SKDH). A Figura 4 apresenta o padrão aloenzimático obtido para *P. sellowii*.

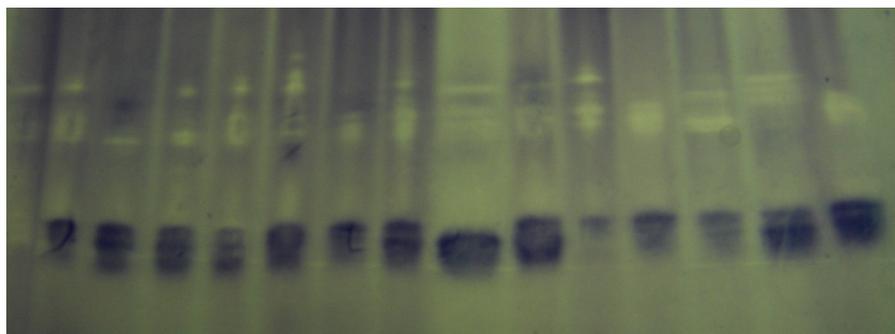


FIGURA 4 Padrão aloenzimático utilizado para a análise genética de *Podocarpus sellowii* (Klotz.). Revelação para enzima fosfoglucomutase (PGM).

Os nove sistemas aloenzimáticos utilizados revelaram 27 zonas de atividade (locos), sendo 10 passíveis de interpretação. As enzimas α -EST, GDH, GLDH, GTDH, MDH, PO, SDH e SKDH apresentaram três zonas de atividade, sendo dois locos descartados devido à difícil interpretação. O loco analisado, localizado na região mais catódica, apresentou estrutura monomérica com dois alelos e bandas acromáticas, com exceção da PO, que apresentou bandas

cromáticas. A enzima PGM também apresentou três zonas de atividade, sendo apenas uma delas descartada devido à baixa resolução das bandas. Dos dois locos analisados, ambos apresentaram enzima monomérica, com dois alelos, sendo que o mais catódico apresentou bandas acromáticas e o mais anódico, bandas cromáticas.

Em estudos de genética de populações em espécies arbóreas, utilizando marcadores aloenzimáticos, o número de locos polimórficos utilizados é bastante variável. Para avaliar a estrutura genética de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb., Souza (2006) utilizou 14 locos polimórficos. Para estudar a distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* MacLeich, Moura (2005) utilizou 21 locos polimórficos. Vieira (2005) utilizou 10 locos polimórficos para a caracterização da diversidade e estrutura genética de populações fragmentadas de *Protium spruceanum* Benth. Jaeger (2004) realizou a caracterização genética e demográfica de populações naturais de Mata de Galeria de *Xylopia emarginata* Mart., utilizando 11 locos polimórficos. Ng et al. (2004) e Telles et al. (2003) consideraram, a partir de quatro locos, um número considerável para se avaliar a variabilidade genética. Porém, Berg & Hamrick (1997) sugerem um mínimo de 10 locos polimórficos para os estudos de diversidade e estrutura genética por aloenzimas. Variável também é o número de indivíduos amostrados em estudos de genética de populações. Para Berg & Hamrick (1997), amostras constituídas de 30 indivíduos por população podem ser consideradas suficientes para a estimativa das frequências alélicas dentro das populações, a partir de marcadores que apresentam locos com padrão de herança codominante. No entanto, Bacles et al. (2004), que fizeram um estudo de frequências alélicas por meio de aloenzimas e amostraram entre dois e 27 indivíduos em oito remanescentes, citaram que a estratégia de amostragem, além de refletir a situação fragmentada da paisagem, variou em função do tamanho e isolamento das populações,

altitude e acessibilidade aos indivíduos. Este estudo apresenta suficiência na amostragem, a partir dos 10 locos polimórficos analisados e dos 232 indivíduos distribuídos nas subpopulações conforme a Tabela 2.

4.2 Frequências alélicas

Nas Tabelas 4 e 5, respectivamente, são apresentadas as estimativas das frequências alélicas das populações e das subpopulações de *P. sellowii*. A análise das frequências alélicas dos 10 locos polimórficos mostra que não ocorreram alelos exclusivos, já que todos segregaram dois alelos. Para as populações, as maiores frequências alélicas foram verificadas em SKDH (alelo 2 = 0,650) população A, PO (alelo 2 = 0,585) população B e MDH (alelo 1 = 0,664) população C. Para as subpopulações foram: SKDH (alelo 2 = 0,717), GTDH (alelo 2 = 0,742), MDH (alelo 2 = 0,650), SDH (alelo 2 = 0,672), PO (alelo 2 = 0,625), SDH (alelo 1 = 0,667), MDH (alelo 1 = 0,648) e MDH (alelo 1 = 0,679) para A1, A2, A3, A4, B1, B2, C1 e C2, respectivamente.

A equidade genética indica que uma menor variabilidade das frequências alélicas em uma população resulta em uma maior diversidade (Frankel et al., 1996). Considerando que os locos que estão em equidade gênica (baixa amplitude de variação) apresentam frequências alélicas entre 0,350 e 0,650 (Frankel et al., 1996), verifica-se que, para o conjunto das populações e para as populações A e B, 100% dos locos apresentam equidade gênica, enquanto, na população C 90% dos locos apresentam equidade gênica (Tabela 4). Para as subpopulações, essa proporção é de 100% nas subpopulações A3, B1 e C1, 90% na subpopulação B2, 80% nas subpopulações A1, A4 e C2, por fim, 60% na subpopulação A2 (Tabela 5).

TABELA 4 Freqüências alélicas e tamanho da amostra (N) em 10 locos aloenzimáticos analisados em *Podocarpus sellowii* (Klotz.) para o conjunto da população e para as três populações.

Loco	Alelo	Populações			
		Conjunto	A	B	C
α -EST	1	0,507	0,492	0,522	0,526
	2	0,493	0,508	0,478	0,474
	N	220	118	45	57
GDH	1	0,421	0,399	0,477	0,424
	2	0,579	0,601	0,523	0,576
	N	221	119	43	59
GLDH	1	0,444	0,423	0,537	0,422
	2	0,556	0,577	0,463	0,578
	N	216	117	41	58
GTDH	1	0,421	0,372	0,500	0,474
	2	0,579	0,628	0,500	0,526
	N	222	125	40	57
MDH	1	0,465	0,364	0,448	0,664
	2	0,535	0,636	0,512	0,336
	N	213	118	40	55
PGM-1	1	0,465	0,468	0,478	0,450
	2	0,535	0,532	0,522	0,550
	N	231	126	45	60
PGM-2	1	0,474	0,508	0,533	0,358
	2	0,526	0,492	0,467	0,642
	N	229	124	45	60
PO	1	0,500	0,529	0,415	0,500
	2	0,500	0,471	0,585	0,500
	N	216	119	41	56
SDH	1	0,451	0,390	0,537	0,518
	2	0,549	0,610	0,463	0,482
	N	216	118	41	57
SKDH	1	0,424	0,350	0,549	0,491
	2	0,576	0,650	0,451	0,509
	N	218	120	41	57

TABELA 5 Frequências alélicas e tamanho da amostra (N) em 10 locos aloenzimáticos analisados em *Podocarpus sellowii* (Klotz.) para o conjunto das subpopulações e para as oito subpopulações.

Loco	Alelo	Subpopulações							
		A1	A2	A3	A4	B1	B2	C1	C2
α -EST	1	0,571	0,450	0,550	0,400	0,524	0,521	0,481	0,567
	2	0,429	0,550	0,450	0,600	0,476	0,479	0,519	0,433
	N	28	30	30	30	21	24	27	30
GDH	1	0,393	0,300	0,516	0,383	0,429	0,523	0,517	0,328
	2	0,607	0,700	0,484	0,617	0,571	0,477	0,483	0,672
	N	28	30	31	30	21	22	30	29
GLDH	1	0,482	0,355	0,433	0,429	0,444	0,609	0,448	0,397
	2	0,518	0,645	0,567	0,571	0,556	0,391	0,552	0,603
	N	28	31	30	28	18	23	29	29
GTDH	1	0,450	0,258	0,383	0,406	0,472	0,523	0,517	0,429
	2	0,550	0,742	0,617	0,594	0,528	0,477	0,483	0,571
	N	30	33	30	32	18	22	29	28
MDH	1	0,308	0,391	0,350	0,400	0,421	0,548	0,648	0,679
	2	0,692	0,609	0,650	0,600	0,579	0,542	0,352	0,321
	N	26	32	30	30	19	21	27	28
PGM-1	1	0,483	0,439	0,453	0,500	0,429	0,521	0,433	0,467
	2	0,517	0,561	0,547	0,500	0,571	0,479	0,567	0,533
	N	29	33	32	32	21	24	30	30
PGM-2	1	0,483	0,530	0,533	0,484	0,571	0,500	0,367	0,350
	2	0,517	0,470	0,467	0,516	0,429	0,500	0,633	0,650
	N	30	33	30	31	21	24	30	30
PO	1	0,643	0,469	0,483	0,533	0,375	0,452	0,603	0,389
	2	0,357	0,531	0,517	0,467	0,625	0,548	0,397	0,611
	N	28	32	29	30	20	21	29	27
SDH	1	0,483	0,333	0,417	0,328	0,400	0,667	0,552	0,482
	2	0,517	0,667	0,583	0,672	0,600	0,333	0,448	0,518
	N	29	30	30	29	20	21	29	28
SKDH	1	0,283	0,333	0,450	0,333	0,475	0,619	0,500	0,481
	2	0,717	0,667	0,550	0,667	0,525	0,381	0,500	0,519
	N	30	30	30	30	20	21	30	27

Os valores semelhantes das frequências alélicas e a alta porcentagem de locos em equidade gênica para as subpopulações A3, B1, B2 e C1, sugere uma baixa divergência entre estas subpopulações. Porém, uma vez que a equidade

gênica não é uma estimativa de estruturação espacial e nem de fluxo gênico, é preciso ter cautela em tais suposições. Esta estimativa apenas gera indícios de diversidade genética intrapopulacional e da baixa amplitude de variação nas frequências alélicas entre locais.

4.3 Índices de variabilidade genética

Os locos analisados em *P. sellowii* apresentaram polimorfismo (\hat{P}) de 100% (Tabela 6). O número de alelos por loco (\hat{A}) foi de 2,0 para o conjunto das populações e para as subpopulações, valor este próximo aos encontrados em estudos de outras espécies arbóreas utilizando marcadores aloenzimáticos (Botrel & Carvalho, 2004; Casiva et al., 2004; Gonzáles & Hamrick, 2005; Gusson et al., 2005; Vieira, 2005; Souza, 2006).

As heterozigosidades médias observadas (\hat{H}_o) e esperadas (\hat{H}_e) apresentaram valores altos tanto para o grupo das populações quanto para as subpopulações e a relação entre a \hat{H}_o e a \hat{H}_e forneceu índices de fixação (\hat{f}) negativos em todas as subpopulações analisadas, evidenciando maior proporção de heterozigotos (Tabela 6). Os valores encontrados se diferenciaram estatisticamente de zero, não estando, portanto, aderidos ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e indicam que há excesso de heterozigotos.

A maioria das subpopulações mostrou semelhanças em relação aos índices de heterozigosidade observada segundo o desvio padrão, com destaque para a subpopulação C2, única a não apresentar diferença para as demais subpopulações, também segundo o desvio padrão (Figura 5). As heterozigosidades esperadas (\hat{H}_e) foram de 0,485 para população A, 0,503 para população B e 0,492 para a população C (Tabela 6). As heterozigosidades esperadas foram muito próximas entre as subpopulações. Os valores de heterozigosidade observada e esperada e seus respectivos desvios padrão para as subpopulações de *P. sellowii* podem ser visualizados na Figura 5.

TABELA 6 Diversidade genética em *Podocarpus sellowii* (Klotz.) nas três populações e nas oito subpopulações estudadas. \hat{A} : número médio de alelos por loco, \hat{P} : porcentagem de locos polimórficos, \hat{H}_o : heterozigosidade média observada, \hat{H}_e : heterozigosidade média esperada e \hat{f} : índice de fixação.

	\hat{A}	\hat{P}	\hat{H}_o	\hat{H}_e	\hat{f}
A	2,0	100,0	0,620 (0,012)	0,485 (0,005)	-0,282* [-0,323 a -0,236]
B	2,0	100,0	0,629 (0,023)	0,503 (0,001)	-0,255* [-0,342 a -0,170]
C	2,0	100,0	0,643 (0,034)	0,492 (0,006)	-0,311* [-0,429 a -0,180]
A1	2,0	100,0	0,658 (0,033)	0,484 (0,011)	-0,370* [-0,461 a -0,261]
A2	2,0	100,0	0,608 (0,016)	0,468 (0,012)	-0,305* [-0,357 a -0,266]
A3	2,0	100,0	0,610 (0,023)	0,497 (0,005)	-0,232* [-0,323 a -0,137]
A4	2,0	100,0	0,608 (0,024)	0,487 (0,007)	-0,255* [-0,335 a -0,174]
B1	2,0	100,0	0,670 (0,036)	0,502 (0,003)	-0,347* [-0,477 a -0,218]
B2	2,0	100,0	0,593 (0,020)	0,499 (0,006)	-0,192* [-0,283 a -0,113]
C1	2,0	100,0	0,679 (0,024)	0,496 (0,005)	-0,377* [-0,457 a -0,289]
C2	2,0	100,0	0,607 (0,047)	0,485 (0,008)	-0,257* [-0,437 a -0,076]

() = desvio padrão; [] = intervalo de confiança; * = significativo a 5% de probabilidade

As heterozigosidades (\hat{H}_o e \hat{H}_e) observadas para *P. sellowii* foram elevadas, ressaltando a alta diversidade genética das populações estudadas. Os valores obtidos foram superiores aos descritos para outras espécies arbóreas como *Eschweilera ovata* por Gusson (2003), em que \hat{H}_o variou de 0,332 a 0,371 e \hat{H}_e variou de 0,354 a 0,431; *Cedrela fissilis* por Póvoa (2002), \hat{H}_o (0,420 a 0,483) e \hat{H}_e (0,366 a 0,435); *Calophyllum brasiliense* em áreas de mata ciliar por Souza (2006), \hat{H}_o (0,327 a 0,493) e \hat{H}_e (0,443 a 0,482); *Protium spruceanum* por Vieira (2005), \hat{H}_o (0,333 a 0,630) e \hat{H}_e (0,332 a 0,507). Vale ressaltar que um estudo realizado por Jaeger (2004) com *Xylopia emarginata*, na mesma região deste trabalho, também apresentou, em média, valores um pouco inferiores. \hat{H}_o variou de 0,377 a 0,764 e \hat{H}_e de 0,342 a 0,432. Valores superiores de \hat{H}_e foram descritos por Melo Júnior (2003) para *Caryocar brasiliense*, variando de 0,450 a 0,530 e \hat{H}_o variando de 0,583 a 0,817.

Quando comparado a outros estudos, os resultados das heterozigosidades obtidos de gimnospermas *P. sellowii* apresentam uma maior diversidade genética, já que a heterozigosidade obtida para *P. sellowii* foi maior do que as estimativas médias encontradas nos gêneros *Abies* (0,130), *Picea* (0,218), *Pinus* (0,136) e *Pseudotsuga* (0,163) (Hamrick et al., 1992). Em outros estudos, também com gimnospermas arbóreas, Mantovani et al. (2006), encontraram para *Araucaria angustifolia* ($\hat{H}_e = 0,389$). Já Souza (2000) para a mesma espécie na região de Campos do Jordão-SP ($\hat{H}_e = 0,263$), Irati-PR ($\hat{H}_e = 0,110$), e Caçador-SC ($\hat{H}_e = 0,124$). Estas diferenças podem ser associadas à história natural de cada uma das populações ou ao registro da exploração de cada área. Em estudos com *Pinus* as heterozigosidades esperadas foram estimadas em 0,179 para *Pinus halepensis* (Loukas et al., 1983), 0,127 em *P. ponderosa* (O'Malley et al., 1979) e 0,146 em *P. rigida* (Guries & Ledig, 1982). Os dados supracitados mostram que os valores de heterozigosidade podem ser diferentes para várias espécies arbóreas, não existindo um padrão para espécies que possuem características ecológicas semelhantes. Segundo Sebbenn et al. (2000), o conhecimento dos dados sobre heterozigosidade são de extrema importância, pois, altos níveis de variabilidade genética possibilitam a ocorrência de um grande número de novas combinações genotípicas, aumentando o potencial evolutivo das espécies, pela maior capacidade de adaptação às possíveis mudanças ambientais. Para Reis (1996) este fator deve, obrigatoriamente, ser contemplado em atividades de coleta de sementes.

O índice de fixação (\hat{f}) foi significativamente diferente de zero em todas as subpopulações, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade, indicando o excesso de heterozigotos em relação aos pressupostos de EHW. Os valores mais acentuados de fixação ocorreram nas subpopulações C1 (-0,377) e A1 (-0,370) e o menor foi observado na subpopulação B2 (-0,192), (Tabela 6). Desvios do EHW em locos supostamente neutros como aloenzimas,

implicam que a população está subdividida, reprodutivamente, em grupos com certo grau de parentesco, cruzamentos não aleatórios (autofecundação e cruzamentos biparentais) ou deriva genética e que, possivelmente, a subdivisão está associada à existência de estruturas de famílias dentro da população (Sebbenn et al., 2003). Para analisar se ocorre ou não a manutenção de heterozigotos em *P. sellowii*, torna-se necessário o estudo das próximas gerações.

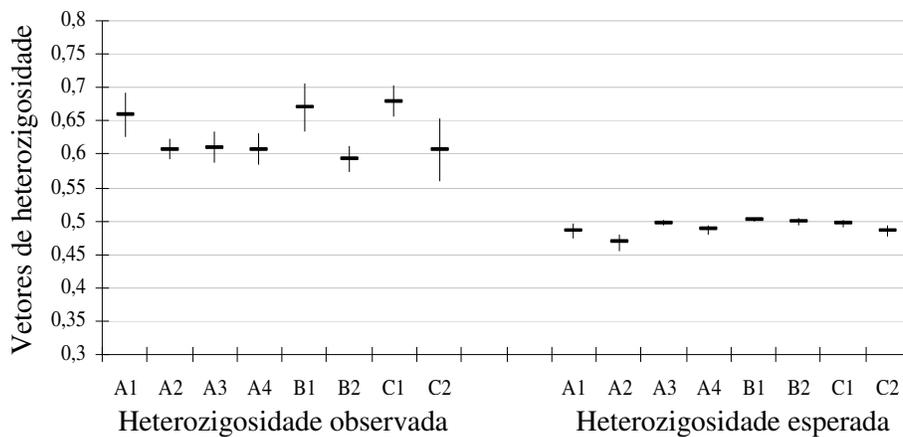


FIGURA 5 Gráfico dos índices de heterozigosidade observada e esperada e seus desvios para as subpopulações de *Podocarpus sellowii* (Klotz.).

4.4 Estrutura genética

Os índices de estrutura genética, no caso, os coeficientes de coancestralidade de Cockerham (Cockerham, 1969; Vencovsky, 1992) para o total das subpopulações são apresentadas na Tabela 7.

As estimativas médias obtidas foram negativas, indicando ausência de endogamia dentro ($\hat{f} = -0,292$) e também no conjunto das populações ($\hat{F} = -0,264$). Os coeficientes médios de endogamia foram significativamente diferentes de zero, de acordo com o intervalo de confiança a 95% de

probabilidade, demonstrando excesso de heterozigotos em relação ao esperado pelas proporções de EHW. Mantovani et al. (2006) também detectaram ausência de endogamia para *Araucaria angustifolia* em um trabalho realizado em Campos do Jordão-SP.

TABELA 7 Estimativas dos coeficientes médios de endogamia dentro das populações (\hat{f}), do conjunto das populações (\hat{F}) e da divergência genética entre populações ($\hat{\theta}_p$) nas subpopulações estudadas para *Podocarpus sellowii* (Klotz.).

Loco	\hat{f}	\hat{F}	$\hat{\theta}_p$
α -EST	-0,097	-0,098	0,001
GDH	-0,380	-0,350	0,022
GLDH	-0,301	-0,290	0,008
GTDH	-0,439	-0,408	0,022
MDH	-0,384	-0,289	0,069
PGM-1	-0,179	-0,191	0,010
PGM-2	-0,246	-0,231	0,012
PO	-0,243	-0,217	0,021
SDH	-0,420	-0,366	0,038
SKDH	-0,246	-0,204	0,034
Média	-0,292*	-0,264*	0,021*
	[-0,357 a -0,226]	[-0,319 a -0,208]	[0,009 a 0,035]

[] = intervalo de confiança (nível de probabilidade de 5%)

* = significativo a 5% de probabilidade

A divergência genética entre as oito subpopulações de *P. sellowii* obtida pela estimativa do $\hat{\theta}_p$ foi baixa ($\hat{\theta}_p = 0,021$). Isso indica que 2,1% da variabilidade genética encontram-se entre as subpopulações e que 97,9% desta variabilidade ocorrem dentro das subpopulações. Jaeger (2004) observou que, na mesma área deste trabalho, 8,7% da variabilidade genética encontra-se entre e 91,7% dentro das populações para *Xylopiya emarginata*. Para Loveless & Hamrick (1984), as espécies tipicamente alógamas apresentam variabilidade

genética alta dentro de populações. A divergência entre populações é reduzida com o aumento do fluxo gênico entre as mesmas. A estimativa de divergência genética encontrada para *P. sellowii* (2,1%) está de acordo com o observado em outras espécies arbóreas tropicais, ou seja, a maior proporção da variabilidade genética encontra-se dentro das populações, dando como exemplo, 6,1% para *Machaerium villosum* (Botrel & Carvalho, 2004), 8,3% para *Xylopia emarginata* (Jaeger, 2004), trabalho realizado no mesmo local deste estudo, 2% para *Caryocar brasiliense* (Melo Júnior et al., 2004), 3,5% para *Eremanthus erythropappus* (Moura, 2005), 3% para *Protium spruceanum* (Vieira, 2005).

As oito subpopulações estudadas foram submetidas à verificação da aderência ao EHW (Tabela 8). O teste exato de Fisher apresentou para *P. sellowii* locos aderidos ao EHW em 70%, 90%, 90%, 80%, 80%, 90%, 50% e 50% dos locos nas subpopulações A1, A2, A3, A4, B1, B2, C1 e C2, respectivamente. Apenas os locos α -EST, PGM-1 e PGM-2 mostraram-se em EHW em todas as subpopulações. Os desvios significativos foram resultantes do excesso de heterozigotos verificado nestes locos. O EHW tem como pressupostos cruzamentos aleatórios, ausência de mutação, migração, deriva genética, seleção e tamanho infinito das populações (Metter & Greg, 1973; Futuyma, 1992). Assim, devido às pressuposições de cruzamentos aleatórios, é esperado que uma população panmítica mantenha inalteradas as frequências de seus alelos a cada geração e apenas a redistribuição dos alelos dentro dos genótipos da nova geração poderá alterar a composição genética da população (Futuyma, 1992).

As estimativas de distância geográfica e divergência genética (F_{ST}) são mostradas na Tabela 9. As divergências genéticas observadas mostraram-se significantes após a correção de Bonferroni em oito ocasiões. A maior divergência está entre as subpopulações A2-B2 (6,8%), seguida pelas subpopulações A2-C1 (5,1%), A4-B2 (4,5%), A1-C2 (4,3%), A1-B2 (4,2%),

A1-C1 (3,2%), A2-C2 (3,2%) e A4-C2 (2,7%). As subpopulações da mesma população não apresentaram valores significativos de divergência genética. Divergências genéticas significativas foram detectadas apenas entre subpopulações de locais distintos. Isso indica que pode estar havendo algum fator limitante do fluxo alélico entre as populações, como por exemplo, o divisor de águas entre as populações que forma uma barreira natural. O mesmo possivelmente não está ocorrendo com as subpopulações de uma mesma população, já que não apresentaram valores significativos de divergência genética.

Um dendrograma foi construído pelo método UPGMA, baseado na matriz de identidade genética de Nei (1978), onde se evidencia os grupos de similaridade, mostrando coerência com as divergências genéticas significativas observadas (Figura 6). A existência de um padrão hierárquico de semelhança genética sugere a forma [(A1, A4, A3, B1),A2],[(B2,C1),C2]. Estes dois agrupamentos com os valores de consistência de 63% e 55%, respectivamente, demonstra uma divergência genética entre as populações A e C e uma similaridade entre subpopulações da população B (intermediária geograficamente) com as das populações A e C. Então sugere-se que a população B poderia funcionar como intercâmbio genético entre A e C, e a sua extinção poderá, num futuro, aumentar a divergência entre estas populações.

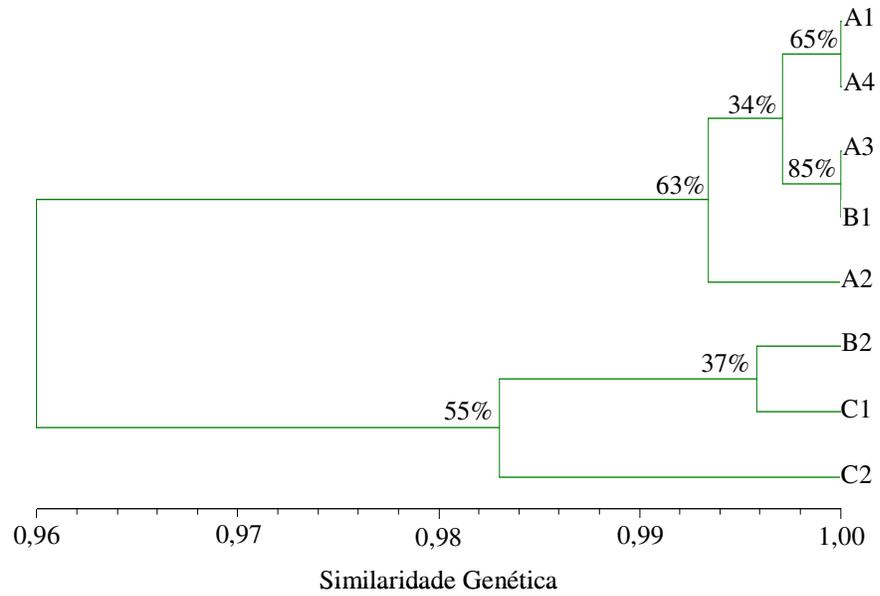


FIGURA 6 Análise de agrupamento das identidades genéticas de Nei (UPGMA) entre as oito subpopulações para *Podocarpus sellowii* (Klotz.).

TABELA 8 Probabilidades do teste exato de Fisher para a hipótese do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os indivíduos de *Podocarpus sellowii* (Klotz.) nas subpopulações estudadas.

Loco	P (Fisher)							
	Subpopulações							
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	C1	C2
α -EST	0,469	0,265	0,265	0,711	0,675	1,0	0,456	0,132
GDH	0,001*	0,217	1,0	0,122	0,001*	0,668	0,009*	0,013*
GLDH	0,021*	0,242	1,0	0,469	0,335	1,0	0,063	0,000*
GTDH	0,061	0,076	0,122	0,029*	0,015*	0,196	0,010*	0,002*
MDH	0,057	0,063	0,052	0,060	0,356	0,394	0,009*	0,025*
PGM-1	0,069	0,160	0,473	0,723	0,663	1,0	0,293	1,0
PGM-2	0,270	0,170	0,139	0,160	0,633	0,218	0,234	0,708
PO	0,093	0,284	0,069	0,025*	0,647	1,0	0,435	1,0
SDH	0,010*	0,102	0,028*	0,671	0,076	0,048*	0,008*	0,021*
SKDH	1,0	0,011*	1,0	0,423	0,068	0,642	0,026*	0,456

* = significativo a 5% de probabilidade

TABELA 9 Distância geográfica (acima da diagonal em metros) e divergência genética – F_{ST} (abaixo da diagonal) de *Podocarpus sellowii* (Klotz.) entre as subpopulações analisadas.

Subpopulações	A1	A2	A3	A4	B1	B2	C1	C2
A1	-	327	634	989	1046	1035	1754	1741
A2	0,019	-	311	695	954	1008	1750	1638
A3	0,006	0,009	-	409	1037	1144	1870	1759
A4	0,005	0,002	0,002	-	1391	1522	2228	2088
B1	0,016	0,010	0,008	0,003	-	206	837	731
B2	0,042*	0,068*	0,022	0,045*	0,016	-	742	708
C1	0,032*	0,051*	0,023	0,029	0,023	0,009	-	285
C2	0,043*	0,032*	0,026	0,027*	0,014	0,024	0,010	-

* significativo após correção de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

4.5 Fluxo gênico

A Tabela 10 apresenta as estimativas de fluxo gênico para cada par de subpopulações. O valor do fluxo gênico estimado a partir da divergência genética reflete o fluxo gênico que ocorreu durante um longo período. A estimativa não indica se está havendo fluxo gênico em determinado evento reprodutivo, mas calcula os níveis que devem ter ocorrido para produzir os padrões observados de estrutura genética (Smouse & Sork, 2004). A amostragem de progênes das subpopulações pode auxiliar no esclarecimento do comportamento das heterozigosidades e do fluxo gênico atual.

Segundo Wright (1931), a deriva genética irá resultar em diferenciação populacional substancial se o número de migrantes for inferior a 1,0. Quando os valores estimados para fluxo gênico são superiores a 1,0, então o mesmo será alto o suficiente para prevenir diferenciação devido à deriva genética. Neste caso apenas A2 x B2 (0,9) encontra-se abaixo de 1,0 e pode anteciper os efeitos de deriva. Segundo Hartl & Clark (1997), quando o fluxo gênico entre populações excede a quatro migrantes por geração, ocorre a homogeneização dos alelos entre estas, que funcionam como populações panmíticas. Logo, de acordo com os resultados (Tabela 10), o número de migrantes entre as subpopulações A1 x A3, A1 x A4, A2 x A3, A2 x A4, A2 x B1, A3 x A4, A3 x B1, A4 x B1, B2 x C1 e C1 x C2 maior que quatro migrantes por geração é suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética (Wright, 1951; Hartl & Clark, 1997).

TABELA 10 Fluxo gênico (\hat{Nm}) obtido a partir das estimativas de divergência genética (\hat{F}_{ST}) entre as oito subpopulações para *Podocarpus sellowii* (Klotz.). N: número de indivíduos analisados; nf: número de subpopulações analisadas.

Subpopulações	N	nf	\hat{F}_{ST}	\hat{Nm}
A1-A2	63	2	0,019	3,3
A1-A3	62	2	0,006	11,2
A1-A4	62	2	0,005	12,0
A1-B1	51	2	0,016	3,9
A1-B2	54	2	0,042*	1,4
A1-C1	60	2	0,032*	1,9
A1-C2	60	2	0,043*	1,4
A2-A3	65	2	0,009	6,8
A2-A4	65	2	0,002	34,4
A2-B1	54	2	0,009	6,5
A2-B2	57	2	0,067*	0,9
A2-C1	63	2	0,051*	1,2
A2-C2	63	2	0,032*	1,9
A3-A4	64	2	0,002	29,1
A3-B1	53	2	0,008	7,9
A3-B2	56	2	0,022	2,8
A3-C1	62	2	0,023	2,6
A3-C2	62	2	0,026	2,3
A4-B1	53	2	0,003	23,2
A4-B2	56	2	0,045*	1,3
A4-C1	62	2	0,028	2,1
A4-C2	62	2	0,027*	2,2
B1-B2	45	2	0,016	3,9
B1-C1	51	2	0,023	2,7
B1-C2	51	2	0,014	4,5
B2-C1	54	2	0,009	7,0
B2-C2	54	2	0,024	2,6
C1-C2	60	2	0,010	6,2
Todas as subpopulações	232	8	0,021	8,8

* significativo após correção de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

A alta divergência genética observada entre as subpopulações A2 x B2, A2 x C1, A4 x B2, A1 x C2, A1 x B2, A1 x C1, A2 x C2 e A4 x C2 reforçada ainda pela baixa similaridade observada a partir da matriz de identidade de Nei (1978), pode estar sendo influenciada pelos baixos valores estimados de fluxo gênico entre as mesmas subpopulações. Os baixos

valores de número de migrantes observados entre as subpopulações citadas são compreensíveis pela presença acentuada do divisor d'águas, que evita um fluxo direto entre essas subpopulações de cursos d'água (populações) diferentes. Logo, a presença do divisor d'águas entre as populações pode estar funcionando como uma barreira geográfica. Quando as populações são analisadas individualmente, evidencia-se considerável fluxo gênico entre as suas subpopulações, o que deixa claro que os afloramentos rochosos que causam as interrupções naturais das formações florestais ao longo dos cursos d'água não funciona como uma barreira geográfica para o fluxo gênico.

No geral, valores de $\hat{Nm} = 8,8$ estimados para o conjunto de subpopulações podem decorrer, entre outros fatores, do grande tamanho populacional da espécie na área estudada e dos mecanismos eficientes de dispersão de sementes e pólen, resultando na alta variação genética dentro das subpopulações e baixa entre elas (Hamrick & Loveless, 1986; Loveless & Hamrick, 1984). Logo, estudos de biologia reprodutiva tornam-se necessários para a melhor compreensão das síndromes de dispersão e polinização de *P. sellowii*, e adicionalmente, melhor caracterização do fluxo gênico, uma vez que a taxa de cruzamento das populações é influenciada por vários fatores ecológicos, como densidade de plantas (Calvo & Horvitz, 1990; van Treuren, 1993; Burd, 1994; Hall et al., 1994; Corbet, 1998; Obayashi, et al., 2002), número de flores por planta (Feinsinger et al., 1986; Franceschinelli & Bawa, 2005), comportamento do polinizador (Ghazoul et al., 1998), sincronia no florescimento e padrões fenológicos (Hall et al., 1994; Hall et al., 1996), além de fatores genéticos, como a variação na auto-incompatibilidade. A taxa de cruzamento é aumentada com a densidade de plantas (Calvo & Horvitz, 1990; Murawski & Hamrick, 1991; van Treuren, 1993; Burd, 1994; Hall et al., 1994; Murawski et al., 1994; Corbet, 1998; Obayashi, et al., 2002).

O teste de Mantel (Manly, 1997) mostrou que existe uma correlação significativa entre as distâncias geográficas e as distâncias genéticas estimadas ($r_m = 0,496$) (Figura 7). Um mesmo caso de correlação

significativa foi descrito por Zucchi et al. (2003) para *Eugenia dysenterica* DC. O coeficiente de correlação entre as matrizes genéticas e geográficas entre as subpopulações de *P. sellowii* sugere que esta estrutura provavelmente originou-se de um processo estocástico como fluxo gênico alto entre subpopulações próximas e baixo entre subpopulações distantes, caracterizando o isolamento pela distância. Sabe-se que o divisor d'água pode estar atuando como barreira geográfica e como as síndromes de polinização e dispersão dessa espécie não são bem conhecidas, estudos sobre a biologia reprodutiva auxiliarão evidenciar o isolamento pela distância detectado. Portanto, o estudo da biologia reprodutiva é necessário para o conhecimento dos mecanismos atuantes do fluxo gênico.

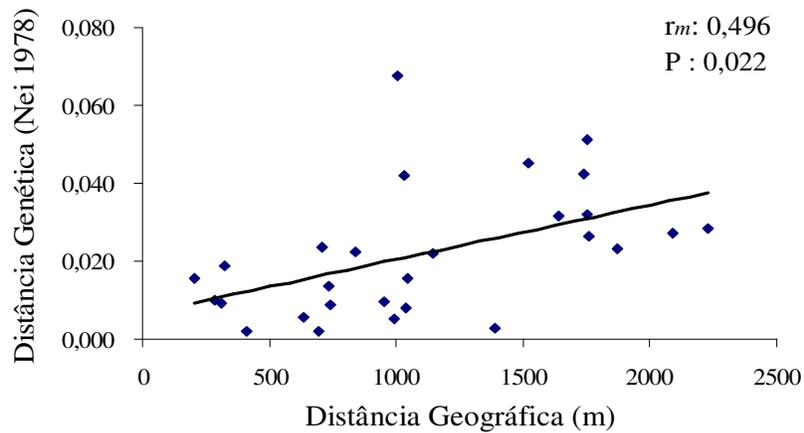


FIGURA 7 Comparação entre a matriz de distância genética (\hat{F}_{ST}) e de distância geográfica (metros) entre as subpopulações para *Podocarpus sellowii* (Klotz.) utilizando o teste de Mantel.

4.6 Distribuição espacial dos genótipos

A maior parte da diversidade gênica para espécies arbóreas é constituída pela variação genética dentro das populações (Hamrick & Godt, 1990), sendo o mesmo observado para *P. sellowii*, com os dados de estrutura

genética. Complementarmente, observou-se a correlação entre a posição geográfica e a distância genética das populações, caracterizando isolamento pela distância. Mediante isso, torna-se necessário investigar como se organiza espacialmente a variabilidade genética das populações.

A estrutura espacial de *P.sellowii* foi obtida por meio da estatística S_p (Vekemans & Hardy, 2004) e do coeficiente de coancestria ($\hat{F}_{(ij)}$), com base em Loiselle et al. (1995), entre plantas para cada uma das classes de distância (Figura 8). Com base nos correlogramas dos coeficientes de coancestria para *P. sellowii*, todas as populações apresentaram distribuição aleatória, exceto a população A, onde nota-se um valor de coancestria significativo e positivo na primeira classe de distância, portanto uma distribuição agrupada até 94 m, ou seja, os indivíduos que estão próximos até 94 m apresentam algum grau de parentesco, estão mais próximos geneticamente. A distância representada por esta classe, além de ser uma informação importante para o manejo, é um distanciamento mínimo entre os indivíduos a serem amostrados, visando à coleta de sementes para programas de melhoramento genético e recuperação de áreas degradadas, maximizando a amostragem para obtenção de maior variabilidade genética. Em trabalho realizado por Mantovani et al. (2006) com *Araucaria Angustifolia*, valores positivos e significativos de coancestria foram encontrados nas primeiras 4 classes de distância, indicando uma estruturação genética de até 70 m. Portanto, uma distribuição agrupada dos genótipos a uma menor distância do que a encontrada para *P. sellowii* (94 m). Estes resultados indicam uma baixa estruturação dos genótipos dentro das populações. Níveis de estruturação similares foram encontrados para outras espécies como, *Pinus ponderosa* (Linhart et al., 1981) e *Pinus contorta* (Epperson & Allard 1989).

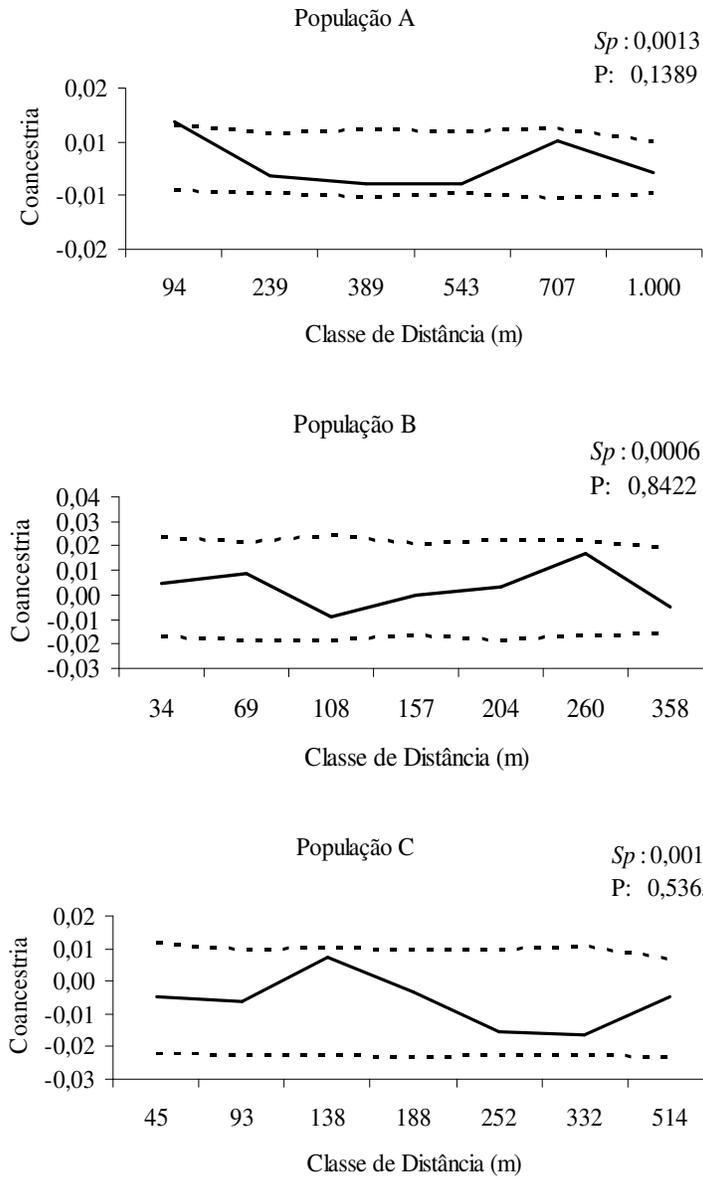


FIGURA 8 Estatística S_p , probabilidade (P) e estrutura genética espacial com coeficiente de coancestralidade ($\hat{F}_{(ij)}$) (Loiselle et al., 1995). Linha cheia representa a regressão do coeficiente $\hat{F}_{(r)}$ contra o logaritmo e, linhas pontilhadas, o intervalo de confiança de 95%.

A análise estatística S_p não apresentou estrutura genética espacial significativa em todas as populações (Figura 8). Isto pode ser corroborado pela alta taxa de fluxo gênico observada entre as subpopulações de uma mesma população. O estudo da estrutura genética espacial, em micro escala em andamento no local, poderá auxiliar na detecção de informações da estrutura das populações. Os métodos empregados na estatística S_p fornecem boa resolução para este nível de abordagem, sendo que em poucos metros é possível identificar famílias genéticas estruturadas significativamente (Fenster et al., 2003; Vekemans & Hardy 2004).

Segundo Hamrick et al. (1993), em áreas com alta densidade de indivíduos, as sementes provenientes de diferentes árvores se sobrepõem, originando uma mistura de diferentes progênies e, nesses casos, é esperada uma fraca estruturação genética espacial.

4.7 Tamanho efetivo populacional

Em todas as subpopulações os valores dos tamanhos efetivos foram superiores ao número de indivíduos amostrados, os valores variaram de 30 até 48 (Tabela 11). Isto se deve ao grande número de indivíduos heterozigotos, indicado pelos índices de fixação negativos observado nas subpopulações. Este fato é esperado, pois a equação utilizada, proposta por Vencovsky (1997), relaciona o tamanho da amostra e o índice de fixação da população, o que resulta em maior representatividade para condições de heterozigose (Sebbenn et al., 2003). Logo, os valores de \hat{N}_e observados reafirmam a existência de baixa endogamia para *P. sellowii* nas subpopulações estudadas.

O tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e) é um parâmetro fundamental quando se pensa em conservações *ex situ* e *in situ*, pois ele trata da representatividade genética das amostras de plantas, sementes ou propágulos. Como as estimativas dos tamanhos efetivos indicam a representatividade genética das amostras a partir das frequências alélicas,

Moraes (1997) ressalta que alguns fatores dinâmicos que afetam a distribuição das frequências dos alelos devem ser considerados. Frankel et al. (1996) atentam para as flutuações do tamanho populacional entre gerações, variação na fertilidade entre indivíduos e sobreposição de gerações.

TABELA 11 Tamanho efetivo (\hat{N}_e) e número de indivíduos amostrados (n) para as subpopulações de *Podocarpus sellowii* (Klotz.).

Subpopulações	\hat{N}_e	n	\hat{N}_e/n
A1	48	30	1,59
A2	47	33	1,44
A3	42	32	1,30
A4	43	32	1,34
B1	32	21	1,53
B2	30	24	1,24
C1	48	30	1,61
C2	40	30	1,35
Conjunto	41	-	-

Vencovsky (1987) relata que as informações a respeito da representatividade genética das matrizes da população (\hat{N}_e) são importantes para a maximização das atividades de coleta de sementes, permitindo, então, calcular o número de matrizes a serem amostradas. Considera, ainda, que, para a coleta de sementes e conservação de germoplasma, é fundamental que se faça o controle gamético feminino, coletando sementes do maior número possível de plantas genitoras (matrizes) e, de preferência, em número igual de cada uma. Com essa prática, reduz-se a variância do número de gametas contribuídos pelas plantas genitoras e aumenta-se o tamanho efetivo. Portanto, as plantas genitoras devem ser tomadas ao acaso e não suas sementes. Em estratégias de enriquecimento da vegetação ou recuperação de áreas, a coleta de sementes a partir deste princípio resultará em inúmeras novas recombinações genotípicas na população, elevando o potencial evolutivo. As relações entre o tamanho efetivo populacional e o tamanho de indivíduos amostrados (\hat{N}_e/n) têm sido utilizadas nas aplicações para

aconservação (Frankham, 1995). Logo, segundo a relação (\hat{N}_e/n) observada para as subpopulações, recomenda-se a coleta de maior número de sementes naquela população em que a relação é menor, assegurando, assim, a manutenção da variabilidade genética nas sementes.

Adicionalmente, desvios significativos do equilíbrio de mutação e deriva (por exemplo: efeitos de gargalo) foram testados por meio da adequação ao modelo de mutação de infinitos alelos (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart & Cornuet, 1998; Piry et al., 1999). Em nenhuma subpopulação foi constatado equilíbrio, indicando ocorrência de gargalos populacionais (*bottlenecks*) recentes (entre 12 gerações, segundo van Rossum & Prentice, 2004) (Tabela 12). Para Luikart et al. (1998), populações que passaram por um recente processo de *bottlenecks* apresentam um excesso temporário de heterozigosidade ($\hat{H}_e > \hat{H}_{eq}$). Isso foi observado em todas as subpopulações, já que, todas as subpopulações apresentam número significativo de locos em excesso de heterozigosidade, ou seja, a heterozigosidade esperada (\hat{H}_e) pelos pressupostos de EHW nos locos polimórficos é maior do que a heterozigosidade esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva (\hat{H}_{eq}). Em decorrência de não se conhecer o histórico da área de estudo, região preservada e não antropizada, a causa da ocorrência de gargalos populacionais é desconhecida.

Van Rossum & Prentice (2004) avaliaram desvios significativos do equilíbrio de mutação e deriva de populações de *Silene nutans* (Caryophyllaceae) na Suécia e norte da Finlândia e encontraram gargalos genéticos recentes em várias populações, sendo interpretados como consequência da fragmentação das populações como resultado de perturbação humana. Ao contrário, Bacles et al. (2004) para *Sorbus aucuparia* (Rosaceae) no sul da Escócia não observaram gargalos genéticos recentes. Os autores citam que há evidências de que a destruição de hábitat na área de estudo é antiga, por volta de 6.000 anos.

TABELA 12 Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Podocarpus sellowii* (Klotz.) nas oito subpopulações, sob o modelo de mutação de infinitos alelos.

Subpopulações	N*	Déficit ¹	Excesso ²	P	Teste de Wilcoxon
A1	4,56	0	10	0,00038	0,00098
A2	4,28	0	10	0,00020	0,00098
A3	4,38	0	10	0,00025	0,00098
A4	4,37	0	10	0,00025	0,00098
B1	4,58	0	10	0,00039	0,00098
B2	4,34	0	10	0,00024	0,00098
C1	4,40	0	10	0,00027	0,00098
C2	4,44	0	10	0,00029	0,00098
Conjunto	3,80	0	10	0,00006	0,00098

* número esperado de locos com excesso de heterozigosidade sob o modelo, seguido por: ¹ locos com déficit de heterozigosidade e ² locos com excesso de heterozigosidade. P = probabilidade.

Luikart et al. (1998) sugerem que, após detectar um gargalo, a probabilidade de que efeitos deletérios do evento possam ser evitados, ou minimizados, é maior, já que procedimentos mitigadores de manejo, ou introdução de imigrantes, podem ser realizados. Adicionalmente, tais práticas podem ser efetivas se associadas ao conhecimento de fatores ecológicos e demográficos das espécies. Confirmando mais uma vez a necessidade do estudo de fatores ecológicos para *P. sellowii* como, por exemplo, biologia reprodutiva. A detecção de populações que experimentaram gargalos populacionais recentes é importante, principalmente, por permitir a análise dos riscos de extinção local, em consequência do tamanho populacional reduzido (Lee et al., 2002).

5 CONCLUSÕES

Todas as subpopulações de *P. sellowii* apresentaram alta quantidade de heterozigotos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando ausência de endogamia.

Os níveis de diversidade genética para *P. sellowii* demonstraram ser altos dentro e baixos entre as populações estudadas, o que é condizente com as outras espécies arbóreas tropicais. Os níveis de diversidade genética dentro das populações são superiores aos relatados para a média das espécies arbóreas tropicais.

Foram observados baixos níveis de fluxo gênico, confirmados pela alta divergência genética, somente nas combinações entre subpopulações pertencentes a populações diferentes, indicando um fator limitante de fluxo gênico entre as populações.

O fluxo gênico mostrou ser suficiente para contrapor os efeitos de deriva genética entre as subpopulações de uma mesma população. Portanto, os afloramentos rochosos ao longo dos cursos d' água não funcionam como barreira geográfica para o fluxo gênico.

Foi detectada correlação positiva entre as matrizes genéticas e geográficas entre as subpopulações, sugerindo o isolamento pela distância.

A estimativa do coeficiente de coancestria para *P. sellowii* mostrou que todas as populações apresentaram distribuição aleatória, exceto a população A, em que os indivíduos que estão próximos, até 94 m, são semelhantes geneticamente e, provavelmente apresentam algum grau de parentesco.

A análise estatística *Sp* não apresentou estrutura genética espacial significativa em todas as populações.

Através dos testes de adequação ao modelo de mutação de infinitos alelos, em nenhuma subpopulação, foi constatada equilíbrio entre mutação e deriva, indicando a ocorrência de gargalos populacionais recentes.

Estudos de biologia reprodutiva são necessários para melhor compreensão das síndromes de dispersão e polinização, na busca de conclusões mais concretas a respeito do fluxo gênico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta diversidade genética observada para as populações de *P. sellowii*, demonstra que há potencial para serem utilizadas em programas de conservação genética. Processos mitigadores, como a introdução de imigrantes, pode ser realizada em áreas que, como essa, sofreu gargalos genéticos, ou quando o fluxo gênico não é suficiente para contrapor os efeitos de deriva. Para a produção de mudas o número de árvores para a coleta de sementes em cada subpopulação deve-se ser próximo ao tamanho efetivo. No caso da população A, deve-se respeitar um limite de 94 m entre as matrizes para a coleta, já que foi observado uma distribuição agrupada a essa distância. Em especial para a área estudada, o manejo e o respeito da legislação que protegem essas áreas devem ser requisitados, a fim de que a alta diversidade genética encontrada seja mantida. A extinção da população B pode aumentar a divergência genética entre as populações A e C. A presença de maciços rochosos, atuando como barreiras para o fluxo gênico, pode influenciar a estrutura genética de *P. sellowii*. Dessa forma, a variação nas estimativas de variabilidade genética pode ser influenciada pelas características peculiares de cada hábitat.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas afins:** fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.
- ANDRADE-LIMA, D. Esboço fitoecológico de alguns brejos de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco**, v. 8, p. 1-27, 1966.
- ANJOS, A. **Análise do padrão de distribuição espacial do palmiteiro (*Euterpe edulis*) utilizando a função K de Ripley.** 1998. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.
- AZEVEDO, M. T. A.; BORBA, E. L.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V. N. High genetic variability in Neotropical myophilous orchids. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, p. 33-40, 2007.
- BACLES, C. F. E.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 573-584, 2004.
- BAWA, K. S.; KRUGMAN, S. L. Reproductive biology and genetics of tropical trees in relation to conservation and management. In: GOMES-POMPA, A.; WHITMORE, T. C.; HADLEY, M. **Rain forest regeneration and management.** Paris: UNESCO, 1990. p. 119-136.
- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.
- BORBA, E. L.; FELIX, J. M.; SOLFERINI, V. N.; SEMIR, J. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 419-428, 2001.

- BOTREL, M. C. G.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 621-627, out./dez. 2004.
- BROWN, A. H. D. Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 52, n. 4, p. 145- 157, 1978.
- BROWN, A. H. D. Enzimes polymorphisms in plant populations. **Theoretical Population Biology**, San Diego, v. 15, n. 1, p. 1-42, 1979.
- BRUNE, W.; ALFENAS, A. C.; JUNGHANS, T. G. Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 200-328.
- BURD, M. Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. **Botanical Review**, New York, v. 60, n. 3, p. 83-139, Jan./Mar. 1994.
- CALVO, R. N.; HORVITZ, C. C. Pollinator limitation, cost of reproduction, and fitness in plants: A transition-matrix demographic approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 136, n. 3, p. 499-516, July/Sept. 1990.
- CASIVA, P. V.; VILARDI, J. C.; CIALDELLA, A. M.; SAIDMAN, B. O. Mating system and population structure of *Acacia aroma* and *A. macracantha* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 1, p. 58-64, Jan. 2004.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Washington, v. 23, n.1, p.72-84, Mar. 1969.
- CORBET, S. A. Fruit and seed production in relation to pollination and resources in bluebell, *Hyacinthoides nonscripta*. **Oecologia**, New York, v. 114, n. 3, p. 349-360, Apr. 1998.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, Dec. 1996.
- CROW, J. F.; AOKI, K. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 19, p. 6. 073-6. 077, 1984.

- DICK, C. W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 753-764, Mar. 2003.
- DUARTE, A. P. Tentativa para explicar a ocorrência de duas espécies de *Podocarpus* no Brasil. **Brasil Florestal**, Rio de Janeiro, v.4, n.13, p.53-66, 1973.
- EITEN, G. Brazilian "Savannas". In: HUNTLEY, B. J.; WALKER, B. H. (Ed.). **Ecology of tropical savannas**. Berlin: Verlag, 1982. p. 25-47.
- EITEN, G. Vegetação do cerradão. In: PINTO, M. N. (Ed.). **Cerrado: caracterização ocupação e perspectivas**. 2.ed. Brasília: UNB, 1993. p. 17-73.
- EPPERSON, B. K. Spatial structure of two-locus genotypes under isolation by distance. **Genetics**, Austin, v. 140, n. 1, p. 365-375, May 1995.
- EPPERSON, B. K. Spatial genetic structure and non-equilibrium demographics within plant population. **Plant Species Biology**, v. 15, p. 269-279, 2000.
- EPPERSON, B. K.; ALLARD, R. W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. **Genetics**, Balatimore, v. 121, n. 2, p. 369-377, Feb. 1989.
- FEINSINGER, P.; MURRAY, K. G.; KINSMAN, S.; BUSBY, W. H. Floral neighborhood and pollination success in four hummingbird pollinated cloud forest plant species. **Ecology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 449-464, Apr. 1986.
- FENSTER, C. B.; VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). **Evolution**, Washington, v. 57, n. 5, p. 995-1007, May 2003.
- FIGUEIREDO, M. A.; FERNANDES, A.; DIÓGENES, M. B.; OLIVEIRA, S. S. **A família Rubiaceae na Serra de Baturité, Ceará**. Mossoró: Coleção Mossoroense, p. 749, 1990.
- FRANCESCHINELLI, E. V.; BAWA, K. S. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). **Heredity**, London, v. 84, n. 1, p. 116-123, Jan. 2000.

FRANCESCHINELLI, E. V.; BAWA, K. S. The post-fire effects on the outcrossing rate of a Brazilian savannah shrub, *Helicteres sacarolha* A. St. - Hil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 163-170, jan./mar. 2005.

FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University, 1981. 327 p.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University, 1996. p. 299.

FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetical Research**, v. 66, p. 95-107, 1995.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631 p.

GHAZOUL, J.; LISTON, K. A.; BOYLE, T. J. B. Disturbance-induced density-dependent seed set in *Shorea siamensis* (Dipterocarpaceae), a tropical forest tree. **Journal of Ecology**, Cambridge, v. 86, n. 3, p. 462-473, June 1998.

GONZALES, E.; HAMRICK, J. L. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum* **Heredity**, London, v. 95, n. 4, p. 306-314, Oct. 2005.

GOTTLIEB, L.D. Gel eletroforesis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, v. 21, p. 939-44, 1971.

GOUDET, J. **FSTAT**, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices: version 2. 9. 3. 2. 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

GURIES, R.R.; LEDIG, F.T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). **Evolution**, Lawrence, n. 36, p. 387-402, 1982.

GUSSON, E. **Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (*Eschweilera ovata* [Cambess.] Miers: subsídios ao manejo e conservação da espécie**. 2003. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 67, p. 123-135, dez. 2005.

- HALL, P.; ORRELL, L. C.; BAWA, K. S. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 9, p. 1104-1111, Sept. 1994.
- HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K. S. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, Malden, v. 10, n. 3, p. 757-768, June 1996.
- HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, Oct. 1982.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROW, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, MA, Sinauer Associates, 1990. p. 43-63.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES, S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In: ADAMS, W. T.; STRAUSS, S. H.; COPEL, D. L.; GRIFFIN, A. R. (Ed.). **Population genetics of forest trees**. Boston: Kluwer Academic, 1992. p. 95-124.
- HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. Isozyme variation in tropical trees. Procedures and preliminary results. **Biotropica**, St. Louis, v. 18, n. 3, p. 201-207, Sept. 1986.
- HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A.; NASON, J. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, The Hague, v. 108, n. 6, p. 281-297, June 1993.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. **Heredity**, v. 83, p. 145-154, 1999.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618-620, 2002.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997.
- HEYWOOD, J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 22, p. 335-355, 1991.

JAEGER, P. **Caracterização genética e demográfica de populações de *Xylopia emarginada* Mart. (Anonáceae)**. 2004. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

JESUS, F. F.; SOLFERINI, V. N.; SEMIR, J.; PRADO, P. I. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, p. 59-68, 2001.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 10. ed. São Paulo: Nacional, 1991. 777 p.

JONES, A. G.; ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 2511-2523, Oct. 2003.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: CONGRESSO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993. **Anais...** São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1993. p. 115-125.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F. B. Recuperação de áreas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO-FILHO, H. F. **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: 2000. p. 249-269.

KAWAGUICI, C. B. **Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae), em mata de galeria**. 2001. Dissertação. (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

KEPHART, S. R. Starch gel eletroforesis of plant isoenzymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 77, n. 5, p. 693-712, May 1990.

KEVIN, K.; NG, S.; LEE, L.; KOH, L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 657-669, May 2004.

KIMURA, M.; WEISS, G. The stepping-stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, Baltimore, v. 49, n. 2, p. 561-576, Apr. 1964.

LAMBERT, S. M.; BORBA E. L.; MACHADO, M. C. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus X albicephalus* (*Melocactus ernestii* X *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, v. 21, p. 93-108, 2006.

LATTA, R. G.; LINHART, Y. B.; FLECK, D.; ELLIOT, M. Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. **Evolution**, Washington, v. 52, n. 1, p. 61-67, Feb. 1998.

LEE, S. -L.; NG, K. K. -S.; SAW, L. -G.; NORWATI, A.; SALWANA, M. H. S.; LEE, C. -T.; NORWATI, M. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 89, n. 3, p. 447-459, Mar. 2002.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data: version 1. 0 (d15). Free program distributed by the authors over the internet from the GDA. 2000. Disponível em: <<http://alley.n.eeb.uconn.edu/gda/2000>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

LIMA, W. P. Função hidrológica da mata ciliar. In: SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR, 1., 1989, Campinas. **Anais...** Campinas, SP: Fundação Cargill, 1989. p. 20-24.

LINHART, Y. B.; MITTON, J. B.; STURGEON, K. B.; DAVIS, M. L. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. **Heredity**, v. 46, p. 407-426, 1981.

LOISELLE, B. A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, Nov. 1995.

LOUKAS, M.; VERGINI, Y.; KRIMBAS, C. B. Isozyme variation and heterozygosity in *Pinus halepensis* L. **Biochemical Genetics**, New York, v.21, n.5/6, p.497-509, 1983.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.

LUIKART, G.; ALLENDORF, F. W.; CORNUET, J. M.; SHERWIN, W. B. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, Cary, v. 89, n. 3, p. 238-247, May/June 1998.

- LUIKART, G.; CORNUET, J. M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, Malden, v. 12, n. 1, p. 228- 237, Feb. 1998.
- LUNA, R.; EPPERSON, B. K.; OYAMA, K. Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. **Heredity**, London, v. 95, n. 4, p. 298-305, Oct. 2005.
- MACHADO, M. C. **O gênero *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae) no estado da Bahia, Brasil**: variabilidade morfológica, variabilidade genética taxonomia e conservação. 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- MAINIERI, C.; PIRES, J. M. O gênero *Podocarpus* no Brasil. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, p. 1-24, 1973.
- MAIXNER, A. E.; FERREIRA, L. A. B. Contribuição ao estudo das essências florestais e frutíferas no estado do Rio Grande do Sul. **Trigo e Soja**, Porto Alegre, n. 18, p. 2, 1976.
- MANLY, B. F. J. **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology**. London: Chapman & Hall, 1997.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity**, Cary, v. 97, n. 5, p. 466-472, Sept. 2006.
- MARKET, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 45, p. 753-763, 1959.
- MARQUARDT, P. E.; EPPERSON, B. K. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 3305-3315, Nov. 2004.
- McCUNE, B.; MEFFORD, M. J. **Multivariate analysis of ecological data**. Gleneden Beach: MjM Software, 1999.
- MELO JUNIOR, A. F. de. **Variabilidade genética em populações naturais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) caracterizada por meio de isoenzima**. 2003. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S. R.; BEAZORTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 66, p. 56-65, dez. 2004.

METTER, I. E.; GREGG, T. G. **Genética de populações e evolução**. São Paulo: USP/Polígono, 1973. 262 p.

MILLER, M. **Tools for populations genetic analyses (TFPGA) 1. 3:** a windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data. Distribuído pelo Autor, 1997.

MORAES, P. L. R. Estrutura genética de população de *Cryptocarya moschata* Nees e *Martius Ex Nees* (Lauráceas). 1997. p. 190. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro.

MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD**. 2005. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MURAWSKI, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In: LOWMAN, M. D.; NADKARNI, N. M. (Ed.). **Forest canopies**. New York: Academic, 1995. p. 457-493.

MURAWSKI, D. A.; GUNATILLEKE, I. A. U. N.; BAWA, K. S. The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 997-1002, Dec. 1994.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, Essex, v. 67, n. 2, p. 167-174, Oct. 1991.

MYAMOTO, M.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. - Mazz. (Betulaceae). **Heredity**, Essex, v. 89, n. 4, p. 273-279, Oct. 2002.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.70, n. 12, p.3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 87, n. 3, p. 583-590, 1978.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 512p.

NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 28, p. 105-128, 1997.

NG, K. K. S.; LEE, S. L.; KOH, C. L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 657-669, Mar. 2004.

NUNNEY, L.; CAMPBELL, K. A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 234-239, July 1993.

O'MALLEY, D. M.; ALLENDORF, F. W.; BLAKE, G. M. Inheritance of isozyme variation and heterozygosity in *Pinus ponderosa*. **Biochemical Genetics**, New York, v. 17, p. 233-250, 1979.

OBAYASHI, K.; TSUMURA, Y.; IHARA-UJINO, T.; NIYAMA, K. ET AL. Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 163, n. 1, p. 151-158, Jan. 2002.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 331-338, abr./jun. 2002.

PASSOS, M. J. **Estrutura da vegetação arbórea e regeneração natural em remanescentes de mata ciliar do rio Mogi Guaçu, SP**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

PEDRALLI, G.; TEIXEIRA, M. C. B. Reservatórios: alternativas para proteção das comunidades vegetais na sua área de influência. In: Ensaio e Dissertações. **A água em Revista**, Belo Horizonte, v. 5, n. 8, p. 34-41, 1997.

PEREIRA, A. C. S.; BORBA, E. L.; GIULIETTI, A. M. Genetic and morphological variability of endangered *Syngonanthus mucugensis* (Eriocaulaceae), from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, p. 401-416, 2007.

PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 597-605, jul./set. 2004.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 40-48, jun. 2004.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Cary, v. 90, p. 502-503, 1999.

PÓVOA, J. S. R. **Distribuição da variabilidade genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas.** 2002. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RAMAKRISHNAN, U.; HADLY, E. A.; MOUNTAIN, J. L. Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 2915-2922, Sept. 2005.

REIS, M. S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius).** 1996. 203 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. “Fisionomias do Bioma Cerrado”. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Cord.). **Cerrado: ambiente e flora.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556 p.

RIBEIRO, P. L.; BORBA, E. L.; SMIDT, E. C.; LAMBERT, S. M.; SCHNADELBACH A. S.; VAN DEN BERG, C. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Plant Systematics and Evolution**, v. 270, p. 109-137, Dec. 2007.

ROCHA, O. J.; AGUILAR, G. Reproductive biology of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica: a comparison between trees left in pastures and trees in continuous forest. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 9, p. 1607-1614, Sept. 2001.

ROHLF, J. F. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.70.** New York: Exeter Software, 1993.

SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. **Biochemical Genetics**, v. 3, p. 37-79, 1969.

SEBBENN, A. M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze] por caracteres quantitativos e isoenzimas.** 2001. 210 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

SEBBENN, A. M. Número de populações para a conservação genética in situ de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 45-51, jun. 2003.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 58, p. 25-40, dez. 2000.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R. Conservação genética *in situ* e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 63, p. 13-22, jun. 2003.

SHAPCOTT, A. The spatial genetics structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 28-38, Jan. 1995.

SILVA, S. M.; SILVA, F. C.; VIEIRA, A. O.S.; NAKAJIMA, J. N.; PIMENTA, J. A.; COLLI, S. “Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares da Bacia do Rio Tibagi, Paraná: 2-Várzea do Rio Bitumirim, Município de Ipiranga, PR” **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, n.1, p. 192-198, Pt.1, 1992. Edição Especial.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, n. 1/3, p. 21-38, Aug. 2004.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification.** San Francisco: W. H. Freeman, 1973.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). **Isoenzymes in plant biology**. Portland: Dioscorides, 1989. p. 5-45.

SORK, V. L.; NANSON, J.; CAMPBELL, D. R.; FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 14, n. 6, p. 219-224, June 1999.

SOUSA, V.A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Goettingen**. Germany: Cuvillier Verlag Goettingen, 2000.

SOUZA, A. M. **Estrutura genética de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. na bacia do alto Rio Grande**. 2006. 154 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. **Biosys-2**. a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Urbana: University of Illinois, 1997.

TELLES, M. P. C.; VALVA, F. D.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annonacrassiflora* Mart. – Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, jan./mar. 2003.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1995. 186 p.

VAN ROSSUM, F.; PRENTICE, H. C. Structure of allozyme variation in Nordic *Silene nutans* (Caryophyllaceae): population size, geographical position and immigration history. **Biological Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 357-371, Mar. 2004.

VAN TREUREN, R.; BIJLSMA, R.; OUBORG, N. J.; VAN DELDEN, W. The effects of population size and plant density on outcrossing rates in locally endangered *Salvia pratensis*. **Evolution**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1094-1104, Dec. 1993.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant population. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 921-935, 2004.

VELOSO, H. P.; GÓES-FILHO, L. Classificação fisionômico-ecológica da vegetação neotropical. **Boletim Técnico Projeto RadamBrasil**, v.7, 1982.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **IPEF**, Piracicaba, v. 35, p. 79-84, 1987.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 15, p. 53-60, 1992. Suplemento, 1.

VENCOVSKY, R. Biometrical approaches for molecular markers estimation of effective population size. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY, 1997, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 1997. p. 233-234.

VIEIRA, F. A. **Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande-MG**. 2005. 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 455 p.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, Baltimore, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. Breeding structure of populations in relation to speciation. **The American Naturalist**, Chicago, v. 74, p. 232-248, 1940.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, Baltimore, v. 28, n. 2, p. 114-138, 1943.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, New York, v. 15, n. 4, p. 323-354, 1951.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, Washington, v.19, n. 3, p.395-420, 1965.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on

allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Shanghai, v. 37, n. 1, p. 141-146, 1996.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

8 ANEXOS – Listas de tabelas e figuras

ANEXO A	Página
TABELA 1A	Altitude e distância geográfica em metros entre as oito subpopulações de <i>Podocarpus sellowii</i> Klotzsch. analisadas..... 17
TABELA 2A	Tamanho amostral (N) para as subpopulações de <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.)..... 18
TABELA 3A	Sistemas enzimáticos testados em <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.)..... 19
TABELA 4A	Frequências alélicas e tamanho da amostra (N) em 10 locos aloenzimáticos analisados em <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.) para o conjunto da população e para as três populações..... 31
TABELA 5A	Frequências alélicas e tamanho da amostra (N) em 10 locos aloenzimáticos analisados em <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.) para o conjunto das subpopulações e para as oito subpopulações..... 32
TABELA 6A	Diversidade genética em <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.) nas três populações e nas oito subpopulações estudadas. \hat{A} : número médio de alelos por loco, \hat{P} : porcentagem de locos polimórficos, \hat{H}_o : heterozigosidade média observada, \hat{H}_e : heterozigosidade média esperada e \hat{f} : índice de fixação..... 34
TABELA 7A	Estimativas dos coeficientes médios de endogamia dentro das populações (\hat{f}), do conjunto das populações (\hat{F}) e da divergência genética entre populações ($\hat{\theta}_p$) nas subpopulações estudadas para <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.)..... 37
TABELA 8A	Probabilidades do teste exato de Fisher para a hipótese do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os indivíduos de

	<i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.) nas subpopulações estudadas.....	41
TABELA 9A	Distância geográfica (acima da diagonal em metros) e divergência genética – F_{ST} (abaixo da diagonal) de <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.) entre as subpopulações analisadas.....	41
TABELA 10A	Fluxo gênico (\hat{Nm}) obtido a partir das estimativas de divergência genética (\hat{F}_{ST}) entre as oito subpopulações para <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.). N: número de indivíduos analisados; nf: número de subpopulações analisadas.....	43
TABELA 11A	Tamanho efetivo (\hat{N}_e) e número de indivíduos amostrados (n) para as subpopulações de <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.).....	49
TABELA 12A	Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.) nas oito subpopulações, sob o modelo de mutação de infinitos alelos.....	51

ANEXO B	Página
FIGURA 1B <i>Podocarpus sellowii</i> Klotzsch.....	6
FIGURA 2B Localização e caracterização das subpopulações da área experimental para <i>Podocarpus sellowii</i> Klotzsch.....	16
FIGURA 3B Imagens dos locais deste estudo. A – Mata de Galeria, subpopulação A2; B – Término da subpopulação A3 perante barreira geográfica “cachoeira”; C – Subpopulação A4; D – Afloramento rochoso entre as subpopulações A3 e A4.....	17
FIGURA 4B Padrão aloenzimático utilizado para a análise genética de <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.). Revelação para enzima fosfoglucomutase (PGM).....	28
FIGURA 5B Gráfico dos índices de heterozigosidade observada e esperada e seus desvios para as subpopulações de <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.).....	36
FIGURA 6B Análise de agrupamento das identidades genéticas de Nei (UPGMA) entre as oito subpopulações para <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.).....	40
FIGURA 7B Comparação entre a matriz de distância genética (\hat{F}_{ST}) e de distância geográfica (metros) entre as subpopulações para <i>Podocarpus sellowii</i> (Klotz.) utilizando o teste de Mantel.....	45
FIGURA 8B Estatística S_p , probabilidade (P) e estrutura genética espacial com coeficiente de coancestralidade ($\hat{F}_{(ij)}$) (Loiselle et al., 1995). Linha cheia representa a regressão do coeficiente $\hat{F}_{(i)}$ contra o logaritmo e , linhas pontilhadas, o intervalo de confiança de 95%.....	47