

**DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE  
GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS  
DE *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish  
POR ISOENZIMAS E RAPD**

**MÁRCIA CRISTINA DE OLIVEIRA MOURA**

**2005**

MÁRCIA CRISTINA DE OLIVEIRA MOURA

**DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES  
NATURAIS DE *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish  
POR ISOENZIMAS E RAPD**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Curso de Doutorado em  
Engenharia Florestal, área de concentração em  
Manejo Ambiental, para a obtenção do título de  
“Doutor”.

Orientadora  
Profa. Dulcinéia de Carvalho

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

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

Moura, Márcia Cristina de Oliveira

Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD / Márcia Cristina de Oliveira Moura. -- Lavras : UFLA, 2005.

165 p. : il.

Orientadora: Dulcinéia de Carvalho.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Eremanthus erythropappus*. 2. Candeia. 3. Estrutura genética. 4. Sistema reprodutivo. 5. Isoenzima. 6. RAPD. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.97355  
-665.3

MÁRCIA CRISTINA DE OLIVEIRA MOURA

**DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES  
NATURAIS DE *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish  
POR ISOENZIMAS E RAPD**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Curso de Doutorado em  
Engenharia Florestal, área de concentração em  
Manejo Ambiental, para a obtenção do título de  
“Doutor”.

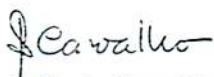
APROVADA em 10 de agosto de 2005.

Prof. Dr. Eduardo van den Berg - UFLA

Profa. Dra. Maria Bernadete Lovato – UFMG

Pesquisador Dr. Alexandre Magno Sebbenn – Instituto Florestal-SP

Pesquisador Dr. Miguel Luiz Menezes Freitas - Instituto Florestal-SP



Profa. Dulcinéia de Carvalho - UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL



*“... desejo também que você plante uma semente,  
por mais minúscula que seja,  
e acompanhe o seu crescimento,  
para que você saiba de quantas  
muitas vidas é feita uma árvore...”*

*Victor Hugo*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e amparo em todos os momentos difíceis de minha vida;

Ao curso de pós-graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade de realizar esse curso; Ao coordenador do curso Prof. Dr. Ary Teixeira de Oliveira-Filho, que me estendeu a mão em momentos que tanto precisei;

À professora Dulcinéia de Carvalho pela orientação, por acreditar em mim (quando nem eu mesma já acreditava...) e, sobretudo, pela amizade sincera ao longo desses anos;

Ao professor Eduardo van den Berg por ter acompanhado esse trabalho, com sugestões e questionamentos. Ao professor Eduardo Beazorti, pela constante disposição em ensinar.

Aos membros da banca de defesa, Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete Lovato, Dr. Miguel Luiz Menezes Freitas e Dr. Alexandre Magno Sebbenn, pelas críticas, sugestões e esclarecimentos que, certamente, muito contribuíram para esse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Ciências Florestais/UFLA pela grata convivência, especialmente aos professores Sebastião Carlos da Silva Rosado, José Tarcísio de Lima, Paulo Fernando Trugilho e José Aldo Alves Pereira. Aos funcionários do DCF/UFLA, pela constante disponibilidade em me ajudar, especialmente à Chiquita, Olívia, Lílian e Claudinha.

Ao pessoal do LEMAF, José Fábio, Charles, Vanete, Dimas e, especialmente, ao Luís Fernando, pela valiosa ajuda no trabalho de campo. Ao Marciel e Ana Carolina, pela ajuda na coleta de sementes. Ao José Carlos, pela coleta em Baependi.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Melhoramento Genético e Recursos Genéticos, Maria Carolina, Evânia, Joema, Ana Cecília, Fábio,

Alisson, Luis Carlos, Anderson, Afrânio, Regiane, Sheila, Livia, Marília, Vássia, Sílvia, Leandra, Lidiane, Miriam e Lilian, pelo delicioso convívio e momentos compartilhados. À amigona Cristiane, “ombro amigo” para os momentos delicados. Ao Peterson, pessoa iluminada, que me ensinou o valor do silêncio e de saber ouvir.

A todos os colegas do curso de pós-graduação em Engenharia Florestal da UFLA, especialmente ao Luciano (Bodinho), Edmilson, Evandro.

A minha família, que sempre acreditou em mim, especialmente ao Fernando, João Augusto e Gina, que me ajudaram nessa etapa final. À Reilda e ao Luís Ricardo, pelas orações, pelo incentivo e pela amizade sincera ao longo desses anos. Ao Celso e à Eda, um porto seguro para os momentos de tempestade. Ao Flávio, Sérgio, Paulo e Andréa, meus irmãos de coração.

Ao Gabriel, meu “companheirinho”, por compreender meus momentos de ausência, pela paciência e por ser a razão da minha vida.

Ao César, pela presença indispensável na minha vida, pelo amor demonstrado, por cuidar tão bem de mim.

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| RESUMO.....  | i      |
| ABSTRACT.....  | iii    |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 1      |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO.....  | 3      |
| 2.1 Ocorrência natural da espécie.....   | 3      |
| 2.2 Características da espécie.....  | 5      |
| 2.3 Importância econômica da espécie.....  | 7      |
| 2.4 Efeitos da fragmentação e do manejo de populações naturais de espécies arbóreas..... | 8      |
| 2.5 Variabilidade genética em populações naturais.....                                   | 10     |
| 2.6 Estrutura genética.....  | 15     |
| 2.6.1 Caracterização da estrutura genética.....  | 18     |
| 2.7 Fluxo gênico.....  | 23     |
| 2.8 Tamanho efetivo.....   | 26     |
| 2.9 Sistema reprodutivo.....   | 27     |
| 2.10 Distribuição espacial dos genótipos.....  | 29     |
| 2.11 Marcadores moleculares no estudo de populações.....                                 | 32     |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 38     |
| 3.1 Caracterização dos locais de estudo.....   | 38     |
| 3.2 Amostragem dos indivíduos.....   | 40     |
| 3.3 Extração das enzimas e análise eletroforética.....                                   | 40     |
| 3.4 Extração do DNA genômico.....  | 43     |
| 3.4.1 Condições de amplificação do DNA genômico.....                                     | 44     |
| 3.4.2 Seleção de <i>primers</i> .....  | 45     |
| 3.5 Análise estatística dos dados de isoenzimas.....                                     | 45     |
| 3.5.1 Análise de segregação.....   | 45     |
| 3.5.2 Análise do desequilíbrio de ligação.....   | 46     |
| 3.5.3 Caracterização da variação genética intrapopulacional.....                         | 47     |
| 3.5.4 Caracterização da estrutura genética das populações.....                           | 50     |
| 3.5.5 Estimativa do fluxo gênico.....  | 55     |
| 3.5.6 Estimativa do tamanho efetivo.....   | 56     |
| 3.5.7 Caracterização do sistema reprodutivo.....   | 58     |
| 3.5.8 Distribuição espacial dos genótipos.....   | 61     |
| 3.6 Análise estatística dos dados RAPD.....  | 63     |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 68     |
| 4.1 Sistemas enzimáticos.....  | 68     |
| 4.2 Padrões de segregação.....   | 70     |
| 4.3 Desequilíbrio de ligação.....  | 76     |

|   |     |
|---|-----|
| 4.4 Sistema reprodutivo .....   | 78  |
| 4.4.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Equilíbrio de Endogamia de Wright ..... | 78  |
| 4.4.2 Homogeneidade das frequências de pólen e óvulos.....                                | 81  |
| 4.4.3 Taxas de cruzamento multilocos e unilocos.....                                      | 86  |
| 4.4.4 Taxas de cruzamentos correlacionados.....   | 91  |
| 4.4.5 Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo de variância.....                      | 94  |
| 4.5 Distribuição espacial dos genótipos.....  | 95  |
| 4.6 Caracterização da variação genética.....  | 105 |
| 4.6.1 Frequências alélicas.....   | 105 |
| 4.6.2 Índices de variabilidade genética.....  | 110 |
| 4.7 Estrutura genética.....   | 113 |
| 4.8 Fluxo gênico.....   | 117 |
| 4.9 Tamanho efetivo.....  | 120 |
| 4.10 Marcadores RAPD.....   | 122 |
| 4.10.1 Seleção dos <i>primers</i> .....   | 122 |
| 4.10.2 Diversidade genética intrapopulacional.....  | 123 |
| 4.10.2.1 Similaridade genética intrapopulacional.....                                     | 126 |
| 4.10.3 Estrutura genética por marcadores RAPD.....  | 134 |
| 4.11 Considerações finais.....  | 140 |
| 5 CONCLUSÕES.....   | 143 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 144 |

## RESUMO

MOURA, Márcia Cristina de Oliveira. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae) por marcadores isoenzimáticos e RAPD.** 2005. 165 p. (Tese - Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

A espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, conhecida popularmente como candeia, apresenta grande potencial econômico, devido à intensa utilização de sua madeira para a fabricação de moirões, sendo atualmente muito visada por indústrias farmacêuticas e de cosméticos para a extração do óleo  $\alpha$ -bisabolol. Devido à sua importância comercial, esta espécie têm sido alvo de intensa exploração. Para minimizar os efeitos da exploração indiscriminada, têm surgido diversas propostas para o manejo sustentado dos candeiais, além de sua inclusão em programas de melhoramento genético e de conservação genética, *in situ* e *ex situ*. No entanto, para que tais programas sejam realmente efetivos, é imprescindível que haja conhecimento sobre os níveis de variabilidade genética existentes em suas populações naturais, como esta está distribuída nessas populações, e também conhecer o sistema reprodutivo desta espécie. Com o objetivo de disponibilizar tais informações, para que estas possam auxiliar no direcionamento dos programas de manejo, melhoramento e conservação, realizou-se o estudo da estrutura genética e do sistema reprodutivo de *E. erythropappus*, por meio de técnicas moleculares (isoenzimas e RAPD). A partir dos dados de 150 indivíduos, distribuídos em cinco populações naturais de *E. erythropappus*, localizadas no Estado de Minas Gerais, Brasil, foi feita a caracterização genética da espécie. Os resultados obtidos por marcadores isoenzimáticos indicam alta variabilidade genética para espécie ( $\hat{H}_e = 0,500$  e  $\hat{H}_p = 0,531$ ). A análise da estrutura genética indicou que a maior parte da variabilidade genética da espécie encontra-se dentro de suas populações naturais ( $\hat{\theta}_p = 0,035$ ). Verificou-se a ausência de endogamia dentro ( $\hat{f} = -0,091$ ) e para o conjunto das populações ( $\hat{F} = -0,052$ ), indicando que as mesmas encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O fluxo gênico estimado para o conjunto das populações foi alto, com  $\hat{N}m = 6,78$ . O tamanho efetivo para o conjunto das populações  $\hat{N}_e$  foi igual a 50, indicando o número mínimo de matrizes para a coleta de sementes, visando a manutenção da variabilidade genética existente. A análise da estrutura genética espacial mostrou que, em duas populações, BR e

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Dulcinéia de Carvalho - UFLA (Orientador).



CR, os genótipos não estavam distribuídos de maneira aleatória. As outras três populações, BM, MP e PB não apresentaram estruturação espacial dos genótipos. A análise de 400 progênies, provenientes de duas populações de *E. erythropappus*, indica que esta é uma espécie alógama, com sistema misto de reprodução ( $\hat{t}_m$  iguais a 0,999 e 0,982, não diferentes da unidade e taxas de cruzamentos individuais  $\hat{t}$  variando de 0,43 a 1,00). Apesar de não ter sido verificada a ocorrência de endogamia nas progênies, as correlações de paternidade indicaram a ocorrência de cruzamentos biparentais ( $\hat{r}_p$  iguais a 0,651 e 0,718). Os níveis de variabilidade genética encontrados nas cinco populações de *E. erythropappus*, obtidos por marcadores RAPD, são elevados, com estimativas da diversidade genética de Nei ( $\hat{H}_e$ ) variando de 0,335 a 0,367 e índice de Shannon ( $\hat{H}_o$ ) variando de 0,498 a 0,539. Embora a maior parte dessa variabilidade esteja contida dentro das populações, os valores de  $\hat{\phi}_{ST}$  iguais a 0,123 e 0,122, estimados pela AMOVA e o índice de Shannon, respectivamente, indicaram divergência moderada entre as populações. A estimativa da correlação de Mantel entre as matrizes de distâncias genética e geográfica foi positiva e significativa ( $r = 0,653$  e  $P = 0,0345$ ), sugerindo que as populações estudadas podem estar se diferenciando por um processo estocástico, com fluxo gênico dependente da distância.

## ABSTRACT

MOURA, Márcia Cristina de Oliveira. Genetic variability distribution of natural *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae) populations obtained by isozymatic markers and RADP. 2005. 165 p. (Doctoral Thesis in Forestry Engineering) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, species known popularly as “candeia”, presents a high economic potential, due to the intense utilization of its wood for stakes production, and more recently, for the extraction of the  $\alpha$ -bisabolol oil by pharmaceutical and cosmetic industries. Due to its commercial importance, this species has been target of predatory exploration. To avoid the negative effects of such exploration, many proposals have been presented for the sustainable management of the populations, such as the inclusion in programs of genetic improvement and conservation *in situ* and *ex situ*. For these programs to be effective, it is indispensable the information about the genetic variability levels in its natural populations, how this variability is distributed in these populations, and the knowledge of the reproductive system of this species. Therefore a study of the genetic structure and the reproductive system of *E. erythropappus* was carried out using molecular techniques (isozymes and RAPD). The genetic characterization of the species was analyzed from the data of 150 individuals, distributed in five natural *E. erythropappus* populations, located in the State of Minas Gerais, Brazil. The results obtained from the isozymatic markers indicate high genetic variability ( $\hat{H}_e = 0.500$  and  $\hat{H}_o = 0.531$ ). The analysis of the genetic structure showed that the major part of the genetic variability of the species is within its natural populations ( $\hat{\theta}_p = 0.035$ ). It was verified the absence of endogamy within ( $\hat{f} = -0.091$ ) and for the population group ( $\hat{F} = -0.052$ ), indicating that these populations are in Hardy-Weinberg Equilibrium. The estimated genetic flow was high, with  $\hat{Nm} = 6.78$ . The effective size of populations ( $\hat{N}_e$ ), which indicates the minimal number of mother plants for seed collection aiming the maintenance of the existing natural variability, was equal to 50 individuals. The analysis of the spatial genetic structure showed that in two populations, the genotypes were not distributed randomly. The other three populations did not show a spatial genotype structure. The analysis of 400 progenies indicated that this is an allogamic species, with a mixed reproduction system ( $\hat{t}_m$  equals to 0.999 and 0.982). Although the

---

<sup>1</sup> Advising Committee: Dulcinéia de Carvalho e Eduardo van den Berg, Universidade Federal de Lavras, (UFLA).

occurrence of endogamy was not verified in the progenies, the paternal correlations indicated the occurrence of biparental crossings ( $\hat{r}_p$  equals to 0.651 e 0.718). The genetic variability levels encountered in the populations of *E. erythropappus*, obtained by RADP markers were high (Nei's diversity ranging from 0.335 to 0.367 and Shannon's index from 0.498 to 0.539). Although the greater part of this variability is present within the populations, the value of  $\hat{\phi}_{ST}$  equals to 0.123 and 0.122, estimated by the AMOVA and the Shannon index, respectively, indicated significant divergence among the populations. The Mantel correlation estimative among the genetic and geographical distances was positive and significant ( $r = 0.653$  e  $P = 0.0345$ ), suggesting that the populations analyzed may be differing by a stochastic process, with a genetic flow dependent of the distance.

# 1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas, nos quais se inserem as populações naturais de espécies arbóreas tropicais, vêm sendo alterados ao longo dos anos, resultando em áreas fragmentadas, formando mosaicos de vegetação remanescente, mergulhados numa matriz antropizada. A redução indiscriminada dos biomas pode reduzir sua diversidade biológica e comprometer o potencial evolutivo das espécies, em função da perda de variabilidade genética, reduzindo o potencial que as populações naturais têm de se adaptarem às mudanças ambientais.

Os estudos genéticos em populações naturais de espécies arbóreas visam ao conhecimento dos níveis de variabilidade genética existente numa determinada espécie, bem como da maneira que esta variabilidade está distribuída entre e dentro de suas populações naturais. Este conhecimento é fundamental para a efetivação de qualquer programa de conservação, manejo e melhoramento genético de uma espécie. Nos estudos populacionais, diversos parâmetros são estimados, permitindo o acesso a informações até então desconhecidas para grande parte das espécies arbóreas tropicais. Dentre estas espécies, a *Eremanthus erythropappus*, conhecida popularmente como candeia, é uma espécie florestal bastante característica no Estado de Minas Gerais. Sua madeira é muito valorizada, devido à sua durabilidade natural e produção de óleo, cujo princípio ativo é utilizado amplamente em indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Devido à sua importância econômica, esta espécie vem sendo explorada de maneira indiscriminada ao longo dos anos.

A exploração de *E. erythropappus*, caracterizada por práticas predatórias, certamente levará a reduções drásticas no tamanho de suas populações naturais, alterando o seu comportamento. Estas alterações podem refletir nos seus padrões de distribuição espacial e no comportamento de espécies relacionadas, como os polinizadores, por exemplo, afetando de forma

negativa a sua estrutura genética. Dentre os resultados dessas alterações, pode-se mencionar a perda de alelos, reduzindo os níveis de variabilidade genética da espécie e as modificações nas taxas de cruzamento, levando à ocorrência de endogamia intrapopulacional. Como consequência, a manutenção e a utilização da espécie, mesmo de forma sustentada, poderão ser comprometidas, devido à erosão genética.

Considerando que o conhecimento da estrutura e da diversidade genética de uma espécie, bem como a compreensão de outros fatores relacionados, é um ponto chave para a adoção de estratégias de manejo mais adequadas para a sua conservação genética, o objetivo geral desse trabalho foi fornecer informações que possam ser utilizadas para a manutenção e conservação de *E. erythropappus*. De maneira específica, este trabalho teve como finalidade:

- i. descrever os níveis de diversidade genética intrapopulacional em cinco populações naturais de *E. erythropappus*, utilizando-se duas classes diferentes de marcadores moleculares;
- ii. estudar a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações naturais, de modo a fornecer informações importantes para programas de conservação e melhoramento genético da espécie;
- iii. estimar o fluxo gênico e o tamanho efetivo das populações;
- iv. estudar o sistema reprodutivo da espécie;
- v. verificar a existência de estruturação genética espacial nessas populações.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Ocorrência natural da espécie

A espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (*Vanillosmopsis erythropappa* Schultz-Bip) pertence à família Asteraceae, sendo conhecida popularmente como candeia, pau-candeia e acende-candeia. Segundo Araújo (1944), o nome candeia é devido à combustão da sua madeira e até mesmo das folhas, que produz uma chama clara e brilhante semelhante a das candeias, não deixando quase resíduos, devido à presença de seu óleo essencial. *E. erythropapus* ocorre naturalmente em áreas montano-campestres nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e, de maneira abundante, em Minas Gerais (Figura 1), formando amplos agregados nos cerrados e campos de altitude (Araújo, 1944), com altitudes variando de 600 a 2000 m (Cândido, 1991).

No processo de sucessão ecológica, *E. erythropapus* é considerada uma espécie pioneira, sendo precursora na invasão dos campos, colonizando solos pobres, arenosos e até mesmo pedregosos (Araújo, 1944; Rizzini, 1981). As árvores dessa espécie crescem em campos e pastagens abertas, com manchas de vegetação baixa, cobrindo rapidamente o terreno, devido à fácil dispersão de suas sementes e à alta adaptabilidade aos solos pobres, formando povoamentos mais ou menos puros (CETEC, 1994), conhecidos como candeiais. Esta espécie também se estabelece em floresta mesófila, após perturbações (Pedralli, 1997), como a abertura de clareiras. Geralmente, os indivíduos de *E. erythropapus* encontrados dentro dessas florestas são maiores, devido à competição com as demais espécies por luz e, portanto, crescendo mais que os indivíduos que formam os candeiais (Silva, 2001). No entanto, à medida que o processo



sucesional da floresta avança, ou seja, à medida que a floresta se torna mais estruturada, o número de indivíduos da espécie diminui (Pedralli, 1997).

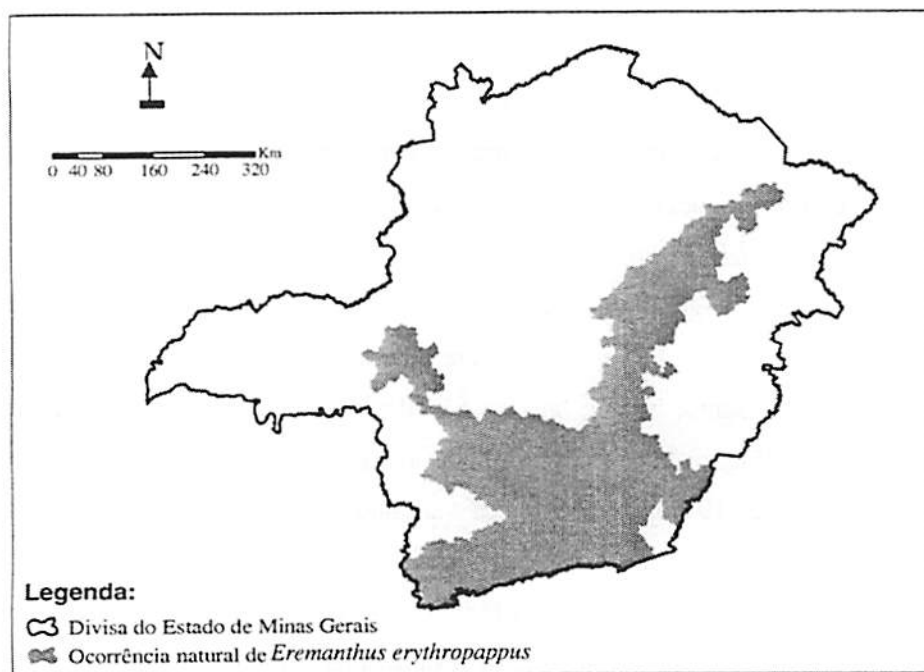


FIGURA 1. Ocorrência natural de *Eremanthus erythropappus* no Estado de Minas Gerais, Brasil (NEMAF, 2005).

Com relação às condições do solo, *E. erythropappus* parece ser pouco exigente, pois ocorre em terrenos bem drenados nos altos das serras, em solos arenosos e pedregosos, onde poucas espécies conseguem se estabelecer (Araújo, 1944). Já com relação às condições climáticas, de acordo com Cândido (1991), a espécie prefere local em que a temperatura anual seja relativamente baixa, porém, sem a ocorrência de geadas. Nos locais de ocorrência natural da espécie, as chuvas são mais ou menos frequentes, com cerca de 1200 a 1600 mm anuais.

## 2.2 Características da espécie

Fisionomicamente, *E. erythropapus* chama a atenção pela dupla coloração de suas folhas, glabra e verde na face superior, tormentosa e alvacentas na face inferior e nos ramos novos (Corrêa, 1931). As folhas são alternas, ovado ou oblongo lanceolado, estreitadas na base e no ápice, acuminadas, subcoriáceas, com sulcos no sentido longitudinal (Rizzini, 1981). Nos indivíduos adultos, o tronco é casquento e acentuadamente gretado (Araújo, 1944) enquanto que, em indivíduos jovens, o caule apresenta-se circundado por cicatrizes e arroxeadas próximo à base (Chaves & Ramalho, 1996). O sistema radicular é homogêneo, com raiz pivotante (Araújo, 1944), pouco desenvolvido, não explorando uma camada de terra muito profunda, sem o afloramento de raízes e sem dilatações na base do tronco. De acordo com o CETEC (1994), o crescimento radicular é rápido e, por não ser muito profundo, adapta-se bem aos solos rasos.

O porte das árvores de *E. erythropapus*, em ambiente de ocorrência natural, está em torno dos 10 metros de altura, com fuste irregular e curto em relação à copa, que se desenvolve no sentido horizontal (CETEC, 1994). Esse formato da copa contribui para o processo de dispersão das sementes de *E. erythroappus* que, por serem muito leves, são facilmente disseminadas pelo vento a distâncias variáveis.

A floração de *E. erythropapus* começa quando a planta atinge os três anos de idade (Cândido, 1991) e, embora a época de floração varie com o lugar e os anos, ela ocorre na época seca, de julho a setembro (Cândido, 1991). O período de frutificação da espécie varia de setembro a outubro (Pedralli, 1997), podendo se estender até novembro (Cândido, 1991; Chaves, 1994), ou seja, a frutificação se dá de dois a três meses após a floração. Os eventos fenológicos da floração e posterior frutificação estão intimamente relacionados às condições ambientais, principalmente à umidade (CETEC, 1994). Nos anos mais secos,

esses eventos ocorrem mais tarde do que em anos de maior precipitação. As condições ambientais também influem na época de amadurecimento das sementes, sendo essa uma característica individual da planta. É comum observarmos indivíduos de *E. erythropapus* próximos apresentando diferentes estágios de floração e frutificação, ou mesmo em um único indivíduo. Essa variação, nos estágios de desenvolvimento floral, pode representar uma estratégia de sobrevivência da planta, uma vez que apresentará, em diferentes épocas, sementes maduras para o seu recrutamento via banco de sementes, quando as condições ambientais forem favoráveis à germinação (Silva, 2003). A floração da candeia, ocorrendo numa época mais seca e fria, a frutificação, ocorrendo com o início da elevação da temperatura, e a dispersão das sementes, coincidindo com o início das primeiras chuvas, representam também uma estratégia de sobrevivência da espécie.

A espécie possui estruturas masculinas e femininas numa única flor (andróginas) que se apresenta em capítulos de cor púrpura nas extremidades dos ramos (Araújo, 1944). Na família Asteraceae, a unidade de dispersão é uma semente aderida a uma estrutura de fruto (Baskin & Baskin, 1998). Nesse caso, o fruto é do tipo cipsela, um aquênio de ovário ínfero. Este fruto possui uma superfície cilíndrica com dez arestas de cor pardo-escura (Araújo, 1944), com aproximadamente 2 mm de comprimento. A distribuição das flores e dos frutos na borda externa da copa facilita a polinização e dispersão dos aquênios pelo vento, graças a uma estrutura denominada “pappus”. A dispersão das sementes é feita pelo vento, mas os frutos que caem no chão podem ainda ser transportados pelo vento, água e até por animais, para locais mais propícios à sua germinação (CETEC, 1994).

### 2.3 Importância econômica da espécie

A *E. erythropappus* é uma espécie submetida a um forte processo exploratório, devido às propriedades da sua madeira. Embora podendo ser utilizada para diversos fins como lenha, confecção de caibros, tacos e vigas, o uso da espécie está mais voltado para a confecção de moirões, postes e esteios, pois apresenta uma grande durabilidade natural. Cândido (1991) ressalta que, embora a *E. erythropappus* apresente uma taxa de crescimento inferior à do eucalipto, sua madeira dura cerca de cinco vezes mais. Nos últimos anos, a exploração da espécie foi intensificada, devido ao aumento da procura de sua madeira para a extração de óleo. Esse óleo essencial possui, como princípio ativo, uma substância denominada alfabisabolol, que é largamente utilizada em indústrias farmacêuticas e cosméticas, pois exhibe propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas e dermatológicas (Cristina, 1989; Rizzini, 1981) e antiulcerogênicas (Nogueira, 2000).

Os produtos de *E. erythropappus* alcançam preços relativamente altos no mercado, fazendo com que a candeia seja uma espécie bem remunerada. A dúzia de moirões custa de R\$35,00 a R\$50,00, enquanto que o metro estéreo da madeira para a extração do óleo varia de R\$50,00 a R\$90,00. Já o quilograma do óleo bruto pode chegar a US\$27,00, ao passo que o alfabisabolol pode ser comercializado por até US\$60,00 no mercado internacional (NEMAF, 2005). Esses valores são interessantes pois mostram a viabilidade econômica dos plantios dessa espécie, o que motiva a condução de programas de melhoramento genético e a elaboração de planos de manejo para essa espécie. No entanto, além da importância econômica, deve-se ter em mente a sua importância ambiental, seja como espécie indicada para recuperar áreas degradadas (Silva, 2003), seja como espécie constituinte de um ecossistema, englobando todas as suas relações com outras espécies e com o próprio ambiente.

## 2.4 Efeitos da fragmentação e do manejo de populações naturais de espécies arbóreas

Uma espécie é formada por populações espalhadas por sua área de distribuição geográfica. Essas populações naturais são fonte de germoplasma para programas de melhoramento genético e também são as unidades sobre as quais incide o manejo para a produção ou conservação dos recursos naturais (Robinson, 1998).

No entanto, os ecossistemas, nos quais as populações naturais estão inseridas, vêm sofrendo diversas alterações, principalmente devido às atividades humanas. Tais mudanças resultam em ecossistemas fragmentados, formando mosaicos de vegetação remanescente, mergulhados numa matriz antropizada. Nesse processo, grandes populações são reduzidas e subdivididas, o que pode acarretar alterações em processos ecológicos e genéticos, como na riqueza e composição de espécies (Murcia, 1995), no comportamento de polinizadores e dispersores (Bawa, 1994; Nason & Hamrick, 1997), no sistema de reprodução (Hall et al., 1996), e no fluxo gênico (Hamrick, 1987; Hamrick et al., 1993)

Young & Boyle (2000) consideram que os possíveis efeitos genéticos da fragmentação são a perda da diversidade genética ao nível de população e de espécie, mudanças na estrutura interpopulacional e aumento da endogamia. Uma baixa variação genética poderia limitar a capacidade de resposta de uma espécie a mudanças ambientais por meio de seleção. Após o processo de fragmentação, as populações remanescentes apresentarão um número de indivíduos menor e, se esse for abaixo do número mínimo adequado ( $N_e$  mínimo), pode ocorrer a intensificação do processo de deriva genética, o que significa ter as frequências de seus alelos afastadas daquelas da população original, podendo até ocorrer a perda de alelos. Além disso, aumenta-se a chance de ocorrência de endogamia,

decorrente da maior probabilidade de autofecundação e cruzamentos entre indivíduos aparentados (Kageyama et al., 1998; Keller & Waller, 2002).

Além do processo de fragmentação, o manejo também pode ser responsável pelas alterações nas populações naturais. Segundo Ratnam & Boyle (2000) as atividades humanas modificam o tamanho e a estrutura da população, tanto da espécie manejada como das outras espécies associadas a ela, alterando sua estrutura genética e seus níveis de diversidade. Jennings et al. (2001) consideram que o manejo pode resultar diretamente na perda de diversidade genética, podendo levar à perda de alelos (especialmente alelos raros) e promovendo um efeito conhecido como gargalo genético, que é o afunilamento da base genética da população. Resultados publicados por Sebbenn et al. (2000b) mostram que o manejo florestal levou a uma perda de alelos raros, redução na diversidade gênica e aumento na taxa de autofecundação em *Tabebuia cassinoides*.

Uma população sob manejo está sujeita a alterações no seu tamanho e nos padrões de distribuição espacial dos seus indivíduos (Bawa & Krugman, 1990) acarretando mudanças na densidade e comportamento dos polinizadores, alterando os níveis de cruzamento (Jennings et al., 2001; Murawski et al., 1994), com o aumento da autofecundação e conseqüentemente da endogamia (Bawa & Krugman, 1990). Nesse caso, a população natural pode estar sujeita à depressão por endogamia (Keller & Waller, 2002), caracterizada pela redução na produtividade, fertilidade, viabilidade das sementes, adaptação e vigor (Falconer & Mackay, 1996; Mettler & Gregg, 1973).

Além desses efeitos, o corte seletivo pode promover uma seleção disgênica (Jennings et al., 2001; Lemes et al., 2003), resultante da contínua exploração de indivíduos superiores, fazendo com que uma grande parte da população remanescente seja constituída por indivíduos de qualidade inferior.



## **2.5 Variabilidade genética em populações naturais**

O estudo genético de populações tem como um dos seus principais objetivos a descrição da quantidade de variação genética existente. Tal variação 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). Desta forma, quanto maior a variabilidade genética existente na população, maiores suas chances de perpetuação. A manutenção da variabilidade genética em populações é a base da conservação de espécies (Yeoh et al., 1996) e, portanto, a sua descrição e distribuição são fundamentais para o estabelecimento de práticas conservacionistas realmente efetivas.

A detecção e quantificação da variabilidade genética também são de grande interesse para o melhoramento genético, que busca variantes genéticas de interesse para serem selecionadas (Torggler et al., 1995). De acordo com Kageyama (1987) a diversidade genética ou variabilidade, devida a diferenças nos alelos pode ocorrer nos seguintes níveis: a) de espécies dentro de ecossistemas, b) de populações dentro de espécies e c) de indivíduos dentro de populações da espécie.

A caracterização da variabilidade genética dentro de populações pode ser efetuada a partir de medidas de diversidade genética intrapopulacional, que poderão ser estimadas a partir de dados de marcadores genéticos. Geneticamente, uma população não é apenas um grupo de indivíduos, mas um grupo de indivíduos que se reproduzem e deixam descendentes e, portanto, além de conhecer a constituição genética dos indivíduos, é necessário determinar como os genes são transmitidos às próximas gerações. Nas progênes, novos genótipos são formados a partir da combinação dos alelos transmitidos pelos

gametas dos genitores e, desta forma, a constituição genética da população em relação aos alelos, que são transmitidos a cada geração, pode ser descrita pelas frequências alélicas (Falconer & Mackay, 1996). A frequência alélica ou gênica é a frequência de um alelo particular em uma população e pode ser estimada contando o número de vezes que cada alelo é encontrado, dividindo-se pelo número total de genes da amostra (Nei, 1987).

A análise dos dados genéticos deve ser baseada em alguma teoria ou modelo (Weir, 1996). O modelo clássico de uma população infinita, de cruzamento aleatório, na ausência de mutação, migração e seleção – Teorema de Hardy-Weinberg – permite que sejam feitas inferências estatísticas. Quando ocorrem desvios das proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg significa que alguma das pressuposições do modelo foi violada e, então, são propostos modelos alternativos para a verificação das possíveis causas do desvio. As principais alterações nas frequências alélicas nas populações naturais podem ser devidas a processos sistemáticos como mutação, fluxo gênico (migração) e seleção natural ou processo dispersivo, como a deriva genética (Falconer & Mackay, 1996).

Considerando uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com  $N$  indivíduos diplóides ( $2N$ ), para um loco com dois alelos  $A_1$  e  $A_2$ , com as frequências genotípicas dos indivíduos homocigotos dominantes ( $A_1A_1$ ), heterocigotos ( $A_1A_2$ ) e homocigotos recessivos ( $A_2A_2$ ) sendo  $P$ ,  $H$  e  $Q$ , respectivamente, podemos calcular que a frequência do alelo  $A_1$  é igual a  $(1/2)(2P + H) = p$ , enquanto que a frequência do alelo  $A_2$  é igual a  $(1/2)(2Q + H) = q$ . Nessa condição de equilíbrio, as frequências genotípicas serão:  $P = p^2$ ,  $H = 2pq$  e  $Q = q^2$ . A ocorrência desse equilíbrio pode ser verificada comparando-se as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio com as frequências genotípicas observadas na população, fazendo o uso do teste do qui-quadrado ou

ainda, do teste exato de Fischer ou a razão da máxima verossimilhança (Weir, 1996).

Outra forma de caracterizar a variação intrapopulacional inclui a variação alélica em locos estruturais (Weir, 1996), tais como a porcentagem de locos polimórficos, o número médio de alelos por loco, o número efetivo de alelos, heterozigosidade observada e a heterozigosidade média esperada segundo as expectativas do EHW.

- **Porcentagem de locos polimórficos (P)**

Um loco é chamado de polimórfico quando a frequência do alelo mais comum é igual ou inferior a 0,95 ou 0,99. Essa determinação de um loco como sendo polimórfico ou não baseia-se em critérios arbitrários, que classificam as frequências alélicas de acordo com a sua maior ou menor ocorrência na população. Segundo Cavalli & Winge (2003) esta limitação impede que um loco cuja ocorrência de um alelo raro esteja sendo mantida simplesmente por mutação recorrente seja considerado polimórfico.

Esta medida expressa, em termos numéricos, a quantidade de polimorfismo e é dada pela razão entre os locos polimórficos e o total de locos da amostra (Torggler et al., 1995). No entanto, esta estatística apresenta alguns problemas que incluem a própria definição de polimorfismo, a dependência do tamanho amostral e o número e tipos de enzimas incluídas na pesquisa (Brown & Weir, 1983). Conforme Nei (1987), a porcentagem de locos polimórficos não é uma boa medida da variação genética, porém, quando um grande número de indivíduos e locos são analisados, ela pode fornecer um aspecto importante dessa variação dentro de populações.

- **Número médio de alelos por loco polimórfico ( $A_p$ )**

É uma medida que caracteriza um componente da diversidade, que é a riqueza alélica (Brown & Weir, 1983). Quando o polimorfismo é alto, espera-se que esta medida também seja alta. No entanto, Nei (1987) considera que, como medida geral de variabilidade, esta estatística apresenta uma séria desvantagem, que é a dependência do tamanho amostral. Esse entrave existe porque existem muitos alelos de baixa frequência em populações naturais e o número de alelos aumenta com o tamanho amostral.

- **Número efetivo de alelos ( $A_e$ )**

O conceito de número efetivo de alelos por loco foi introduzido por Kimura & Crown (1964) e é definido como o recíproco da homozigidade esperada em cada loco por  $A_e = 1/\sum p_i^2$ , em que  $p_i$  é igual às frequências alélicas de cada loco  $i$ , calculando-se em seguida a média aritmética para todos os locos. Murawski & Bawa (1994) consideram que ela reflete o número de alelos necessário dentro de um loco para manter o nível atual de heterozigidade.

- **Heterozigidade média esperada ( $H_e$ )**

A medida mais completa de variabilidade genética intrapopulacional é o grau de heterozigidade esperada, pois sumariza a variação genética de uma população em uma única estatística (Berg & Hamrick, 1997). Nei (1987)

considera que, por não depender da definição arbitrária de polimorfismo, a heterozigosidade média é uma medida mais apropriada de variação genética.

Em uma população de cruzamentos ao acaso, seja  $p_i$  a frequência populacional do  $i$ -ésimo alelo em um loco, a heterozigosidade para este loco pode ser definida como:

$$\hat{h} = 1 - \sum p_i^2$$

Nei (1987) considera que a média dessa quantidade sobre todos os locos é a heterozigosidade média ( $\hat{H}$ ), sendo a proporção média de heterozigotos por loco em uma população de cruzamentos aleatórios, sendo igual a proporção esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg de locos heterozigóticos em um indivíduo escolhido ao acaso.

No entanto, essa interpretação não é válida para casos em que as frequências genotípicas desviam-se das proporções de Hardy-Weinberg. Neste caso, Nei (1973, 1987) considera  $\hat{H}$  a probabilidade de que dois genes escolhidos ao acaso numa população sejam diferentes, sendo equivalente a heterozigosidade, e a chama de diversidade gênica. Assim, a heterozigosidade média esperada ou diversidade gênica é uma medida de variação genética e seu complemento é dado pela identidade genética ( $\hat{J}$ , sendo  $J = 1 - \hat{h}$ ). Desta forma, independente de efeitos de migração, seleção, mutação ou sistema reprodutivo, este valor permite uma idéia do nível de variação genética em uma população de uma determinada espécie.

Brown & Weir (1983) consideram como principais vantagens da  $H_e$ , como medida de variabilidade, sua relativa insensibilidade ao tamanho amostral quando comparada a outras medidas e a fácil interpretação do seu significado e, como desvantagem, sua dependência da frequência dos dois alelos mais comuns. Diversos estudos têm mostrado que a variabilidade genética difere entre espécies

(Tabela 1). Os níveis de variabilidade nas populações são afetados por uma variedade de características genéticas e ecológicas e dos históricos de vida das espécies, tais como, distribuição geográfica, sistema de reprodução, mecanismos de dispersão de pólen e sementes (Brown, 1978; Hamrick, 1983).

Tabela 1. Número de populações (np), número de locos (nl), porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}$ ), número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_e$ ) para algumas espécies arbóreas tropicais, obtidos por marcadores isoenzimáticos.

| Espécie                       | np | nl | $\hat{P}$ | $\hat{A}$ | $\hat{H}_e$ | Referência         |
|-------------------------------|----|----|-----------|-----------|-------------|--------------------|
| <i>Cedrella fissilis</i>      | 1  | 8  | 76,9      | 2,31      | 0,243       | Gandara (1996)     |
| <i>Genipa americana</i>       | 2  | 8  | 50        | 1,63      | 0,182       | Sebbenn (1997)     |
| <i>Pithecellobium elegans</i> | 8  | 6  | 35        | 1,24      | 0,130       | Hall et al. (1996) |
| <i>Bauhinia forficata</i>     | 1  | 4  | 100       | 3,75      | 0,451       | Santos (1994)      |
| <i>Euterpe edulis</i>         | 8  | 7  | 87,5      | 2,98      | 0,446       | Reis (1996b)       |
| <i>Cariniana legalis</i>      | 4  | 14 | 100       | 2,87      | 0,355       | Sebbenn (2001)     |
| <i>Caryocar brasiliense</i>   | 4  | 10 | 100       | 2,80      | 0,499       | Melo Júnior 2003)  |
| <i>Xylopia emarginata</i>     | 2  | 11 | 100       | 1,72      | 0,410       | Jaeger (2004)      |

## 2. 6 Estrutura Genética

Brown (1978) define estrutura genética como sendo a forma pela qual a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie. Como os indivíduos de uma espécie raramente se distribuem de maneira homogênea no espaço (Robinson, 1998), eles quase sempre formam agregados, bandos, colônias ou qualquer outro tipo de associação. Dessa forma, a estrutura genética de populações refere-se à



heterogeneidade na distribuição dos genótipos e do grau de endogamia dentro de populações e entre estas. Loveless & Hamrick (1984) consideram que a estrutura pode ser manifestada entre distintas populações geográficas, dentro de um grupo local e até mesmo em grupos de progênies, podendo ainda ser definida como a distribuição não aleatória dos alelos e genótipos (Hamrick, 1987).

O fundamento dos estudos de estrutura genética parte do teorema de Hardy-Weinberg. Este modelo assume, sob certas premissas (já mencionadas no tópico anterior), que a abundância relativa dos alelos não muda de uma geração para outra; a única mudança na composição genética da população é a redistribuição dos genótipos em frequências que serão mantidas em todas as gerações subsequentes (Futuyma, 1992).

Assim, tomando-se como referência o teorema de Hardy-Weinberg, as principais forças microevolutivas podem ser consideradas como desvios deste equilíbrio e, portanto, a formação e manutenção da estrutura genética ocorre devido às interações de um conjunto complexo de fatores evolutivos, tais como a variação no conjunto gênico, organização desta variação dentro dos genótipos, distribuição espacial dos genótipos, sistema de reprodução, dispersão das progênies, seleção, deriva genética, mutação, fluxo gênico, eventos casuais, além de processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos, que irão originar as futuras populações (Brown, 1978; Hamrick, 1983; Loveless & Hamrick, 1984).

Hamrick (1989) considera que, em geral, a seleção e a deriva genética aumentam a diferenciação entre as populações, enquanto que espécies que apresentam intenso movimento de pólen e sementes têm menor diferenciação do que espécies com fluxo gênico restrito. Espécies com grandes populações, que apresentam sistema misto de reprodução e mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes apresentam, de maneira geral, alta variação genética dentro das populações e baixa entre estas. Por outro lado, espécies com

pequenas populações, de autofecundação e/ou propagação vegetativa, com limitada dispersão de pólen e sementes tendem a apresentar uma baixa variabilidade dentro de suas populações e alta entre estas (Loveless & Hamrick, 1984; Zanettini & Cavalli, 2003).

A variabilidade genética para locos neutros de espécies arbóreas tropicais está concentrada dentro das populações, apresentando baixos valores de diferenciação entre estas (Tabela 2). Estudos sobre a distribuição da variação genética em espécies tropicais, realizados por Loveless & Hamrick (1987) mostram valores baixos de diferenciação populacional ( $\hat{G}_{ST}$  médio = 0,050), indicando que, para as oito espécies estudadas, 95% da variabilidade genética estão contidas dentro das populações.

Para a compreensão da estrutura genética nas populações naturais de plantas, além dos fatores já mencionados, é fundamental o estudo das variáveis ecológicas que influem nessa estruturação. Existem vários fatores que promovem a divergência entre populações, como a autogamia ou alogamia com certo grau de endogamia; a morfologia floral a qual favorece ou dificulta certos tipos de cruzamentos; a ação limitada de polinizadores e dispersores, diretamente relacionada ao fluxo gênico; o estágio sucessional e o reduzido tamanho populacional. Loveless & Hamrick (1984) procuraram avaliar a influência destas variáveis biológicas e concluíram que espécies com reprodução preferencialmente alógama, com amplo fluxo de pólen e sementes, pertencente ao estágio final de sucessão, com ciclo de vida longo, tendem a apresentar menor diferenciação entre suas populações.

Tabela 2. Distribuição da variabilidade isoenzimática em populações naturais de espécies arbóreas tropicais, segundo abordagem pela estatística F de Wright.

| Espécie                       | Np | $\hat{F}_{IS}$ | $\hat{F}_{IT}$ | $\hat{F}_{ST}$ | Referências        |
|-------------------------------|----|----------------|----------------|----------------|--------------------|
| <i>Myracrodruon urundeuva</i> | 2  | 0,449          | 0,517          | 0,035          | Moraes (1992)      |
| <i>Euterpe edulis</i>         | 8  | -0,067         | -0,033         | 0,031          | Reis (1996b)       |
| <i>Chorisia speciosa</i>      | 4  | 0,115          | 0,278          | 0,183          | Souza (1997)       |
| <i>Cedrela fissilis</i>       | -  | -              | 0,196          | 0,089          | Gandara (1996)     |
| <i>Copaifera langsdorffii</i> | 3  | -              | 0,130          | 0,131          | Oliveira (2000)    |
| <i>Caryocar brasiliense</i>   | 4  | -0,449         | -0,420         | 0,020          | Melo Júnior (2003) |
| <i>Xylopia emarginata</i>     | 5  | -              | -0,298         | 0,083          | Jaeger (2004)      |

np: número de populações estudadas.

### 2.6.1 Caracterização da estrutura genética

Modelos matemáticos derivados do teorema de Hardy-Weinberg possibilitam quantificar a estrutura genética das populações sob estudo, além de caracterizar seus eventos determinantes, permitindo assim o entendimento do comportamento dos alelos e a dinâmica das populações naturais.

Existem diferentes métodos estatísticos para caracterizar a estrutura genética populacional, dos quais citam-se: as estatísticas F (Wright, 1951); a diversidade genética de Nei (1973) e as análises de variância das frequências alélicas (Cockerham, 1969; Weir, 1996).

Na presença de equilíbrio de Hardy-Weinberg, pode-se dizer que não existe nenhum nível de estruturação dentro da população, sendo que a transmissão dos alelos se dá de maneira aleatória e a ocorrência de um alelo num

loco independe da ocorrência de outro alelo no mesmo loco (Carlini-Garcia, 2001). No entanto, diversos fatores podem levar a população a se desviar desta condição de equilíbrio, entre eles o sistema reprodutivo. Quando a taxa de autofecundação difere de zero ou quando há cruzamento entre indivíduos aparentados, ocorre a endogamia, conduzindo a um desvio do EHW. Wright (1922) propõem uma medida desse desvio, denominado *coeficiente de endogamia*. Esse coeficiente mede a redução da heterozigose a partir do teorema de Hardy-Weinberg. No entanto, mesmo em espécies alógamas, o EHW deixa de existir na presença de cruzamentos preferenciais, caracterizando uma estruturação dentro da população. Além disso, podem existir outras causas para este aumento da homozigose na população, como a ocorrência de deriva genética. Por isso, talvez seja mais adequado utilizar o termo *índice de fixação* para medir tais desvios.

O índice de fixação pode ser definido como a correlação entre os alelos nos gametas que formam o zigoto. Wright (1951) também estabeleceu o *índice de panmixia*  $P$ , sendo  $P = 1 - F$ . Malécot (1948), por sua vez, interpreta o coeficiente  $F$  como a probabilidade de dois alelos presentes num loco de um indivíduo serem idênticos por descendência. Desta forma, o *índice de fixação* pode ser considerado como a correlação entre dois gametas, relativa à geração parental, com o seu valor variando de  $-1$  a  $+1$  ou como a probabilidade de identidade por descendência na geração a qual pertencem, com seu valor variando de  $0$  a  $+1$ . Em termos numéricos, ambos os métodos dão o mesmo resultado; a diferença estará apenas nas interpretações. No entanto, segundo Wright (1965), as correlações se assemelham às probabilidades, pois correlações entre gametas, calculadas a partir de genealogia, não podem ser negativas.

Quando o índice de fixação difere de zero, significa que está ocorrendo desvio do EHW e, neste caso, a população pode atingir outro estado de equilíbrio, denominado Equilíbrio de Wright (Equilíbrio com Endogamia).

Assim, numa população em equilíbrio, com um índice de fixação médio  $F$ , as frequências genóticas passarão a ser:  $P = p^2 + Fpq$ ,  $H = 2pq(1 - F)$  e  $Q = q^2 + Fpq$ . Pelas expressões, nota-se que, se  $F$  é igual a 1, a população será completamente homocigótica.

Wright (1951) considera o coeficiente  $F$  como uma medida do grau de desvio do EHW nas populações. Como nas populações naturais podem ocorrer vários níveis de estruturação, o autor, diante da necessidade de mensurar todos os desvios possíveis, propôs um sistema aplicável a uma população com um nível hierárquico de subdivisão. Considerando a população como um todo ( $T$ ), suas subpopulações ( $S$ ) e seus indivíduos ( $I$ ), foram definidos os seguintes parâmetros:  $F_{IT}$  como a correlação entre os gametas que se unem para formar os indivíduos em relação à população,  $F_{ST}$  como a correlação entre gametas tomados ao acaso nas subpopulações e mede o nível de diferenciação genética entre subpopulações (Crow & Kimura, 1970; Wright, 1965) e  $F_{IS}$  como a correlação entre gametas que se unem para produzir indivíduos com relação à subpopulação. Wright (1951, 1965) estabeleceu a relação  $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$ , sendo que o grau de endogamia dentro da população pode ser expresso como  $F_{IS} = (F_{IT} - F_{ST}) / (1 - F_{ST})$ .

Nei (1973) propôs uma metodologia alternativa para a análise de populações subdivididas que não requer o conhecimento das frequências genóticas, podendo ser estimadas a partir das frequências alélicas em termos de heterozigiosidade. Esta metodologia fornece a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações e baseia-se nas identidades e diversidades gênicas.

Como já mencionado anteriormente, a heterozigiosidade esperada em EHW  $H_e$  é calculada por  $\hat{H} = 1 - \sum p_i^2$ , sendo  $p_i$  a frequência do alelo  $i$  na população. Para locos múltiplos, calcula-se a média aritmética dos valores de  $\hat{H}$  sobre todos os locos e, por isso, considera-se esta estatística como uma



versão multialélica das estatísticas  $F$  (Nei, 1973), sendo mais facilmente estendida para locos com alelos múltiplos do que a estatística de Wright (Robinson, 1998). A heterozigosidade esperada média total das subpopulações ( $\hat{H}_T$ ) é decomposta em seus componentes  $\hat{H}_S$ , que corresponde à média ponderada dos valores de  $\hat{H}$  calculados para subpopulações e representa a parte atribuída à variabilidade genética dentro de subpopulações e  $\hat{D}_{ST}$  que é o componente da variabilidade atribuído à diferenciação entre subpopulações. Dessa forma, temos que  $\hat{H}_T = \hat{H}_S + \hat{D}_{ST}$ . Nei (1973) fornece ainda uma razão que mostra a proporção da variabilidade total explicada por diferenças genéticas entre as subdivisões da população, que é expressa por  $\hat{G}_{ST} = \hat{D}_{ST} / \hat{H}_T$ .

A estatística  $G_{ST}$  é uma medida de diferenciação genética largamente utilizada, pois não é afetada pelo sistema reprodutivo da espécie, pelo número de alelos por loco e pela atuação de forças evolutivas (migração, seleção e mutação). Seus valores variam de 0 a 1 e, de acordo Yeh (2000), valores menores que 0,050 representam baixos níveis de diferenciação genética, enquanto que valores acima de 0,151 indicam uma grande diferenciação.

Cockerham (1969) e Weir & Cockerham (1984) estabeleceram uma outra metodologia para se estudar a estrutura genética de populações a partir de marcadores codominantes, denominada análise de variância de frequências gênicas. Esta metodologia baseia-se na pressuposição de que as populações em estudo são oriundas de uma mesma população ancestral, permitindo, assim, a estimativa de coeficientes de coancestralidade e endogamia. Na ausência de forças perturbadoras, as populações têm as mesmas frequências alélicas. O processo de amostragem genética (deriva), ao longo das gerações, promove diferenciação intraespecífica e esta pode ser quantificada pela análise das frequências gênicas. Como a variância é uma propriedade dessas frequências,

sua análise permite descrever a estrutura genética das populações (Cockerham, 1969; Weir, 1996).

Este método pressupõe um modelo aleatório, havendo uma população de referência a partir da qual as populações ou subpopulações a serem estudadas se originaram por deriva genética, ou seja, o modelo de Cockerham (1969) admite geneticamente que a diversidade entre as populações foi provocada pela deriva genética, ocorrida em gerações passadas (Vencovsky, 1992). Além disso, os locos a serem analisados devem ser neutros, não podendo estar submetidos a nenhuma pressão de seleção.

Cockerham (1969) aborda a estruturação em populações através das covariâncias entre pares de alelos estimadas a partir de coeficientes de coancestralidade entre indivíduos ou grupos, sendo estes obtidos a partir da decomposição dos componentes da análise de variância das frequências alélicas. Considerando indivíduos diplóides, amostrados a partir de várias populações, as três medidas propostas pelo autor são:

$F$  ( $F_{IT}$  de Wright): é a correlação entre alelos dentro de indivíduos em todas as populações, representando o coeficiente de endogamia dos indivíduos em relação ao conjunto de populações;

$\theta$  ( $F_{ST}$  de Wright): é a correlação de todos os alelos de diferentes indivíduos na mesma população. É o coeficiente de coancestralidade e mede a divergência entre populações;

$f$  ( $F_{IS}$  de Wright): é a correlação dos alelos dentro de indivíduos dentro da população a qual estes indivíduos pertencem, ou seja, representa grau de endogamia dentro de populações e pode ser expresso como  $f = (F - \theta) / (1 - \theta)$ .

Desta forma, a análise das frequências alélicas fornece os níveis de fixação de alelos médios dentro das populações ( $f$ ) e totais da população ( $F$ ) e a divergência genética entre populações ( $\theta_p$ ), sendo estes parâmetros relacionados por  $f = (F - \theta_p) / (1 - \theta_p)$ .

Na análise da estrutura genética de populações naturais, diversos autores têm utilizado as estatísticas F de Wright (Eguiarte et al., 1992; Giudice Neto, 1999; Lacerda et al., 1999). Outros utilizam a partição da diversidade genética de Nei (Loveless & Hamrick, 1987; Murawski & Bawa, 1994), enquanto que muitos abordam a estrutura genética pelo modelo de Cockerham (Sebbenn, 2001; Jaeger, 2004). As três metodologias também têm sido utilizadas simultaneamente por alguns autores (Moraes, 1992; Reis, 1996b; Melo Júnior, 2003). Destas, a análise de variância das frequências alélicas apresenta uma maior precisão (Reis, 1996b; Sebbenn, 2001), pois considera os dados como uma amostra da população e suas estatísticas, sendo estimativas de um parâmetro populacional verdadeiro, estão associadas a um erro amostral. As estatísticas de Wright e a diversidade genética de Nei, por sua vez, não consideram o erro associado à amostragem e, por isso, elas tendem a ser viciadas, principalmente se o tamanho amostral for pequeno.

## **2.7 Fluxo gênico**

As espécies arbóreas estão sujeitas a forças evolutivas que afetam a distribuição da variação genética dentro e entre as suas populações. A seleção natural favorece a adaptação a gradientes ambientais, podendo gerar diferenciação genética entre as populações ou subdivisões numa população. Enquanto que fatores, como o tamanho pequeno de uma população e a endogamia, os quais reduzem a variação genética dentro da população via deriva genética, podem contribuir para o desenvolvimento de uma heterogeneidade genética entre populações, o fluxo gênico promove uma homogeneização espacial da variação genética. Segundo Hamrick & Nason (2000), embora a estrutura genética de uma população resulte de complexas interações entre seleção, deriva e fluxo gênico, as espécies arbóreas com altas taxas de fluxo



gênico tendem a apresentar maior variação genética distribuída dentro de suas populações e menor entre estas, quando comparadas a espécies com movimento de genes limitado.

Neigel (1997) define fluxo gênico como o movimento de genes em populações, incluindo todos os movimentos de gametas e propágulos que efetivamente trocam genes na distribuição espacial. Conforme Slatkin (1981, 1985) o fluxo gênico é uma termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra. As plantas dispersam seus genes durante dois estágios de vida: a dispersão do pólen antes da fertilização e a dispersão da semente após fertilização e desenvolvimento do embrião. A ocorrência de dormência nas sementes de algumas espécies gera uma sobreposição de gerações sucessivas, funcionando como um mecanismo de fluxo gênico no tempo. Futuyma (1992) descreve quatro modelos básicos de fluxo gênico: a) o modelo continente-ilha, em que o movimento dos genes é unidirecional, partindo de uma população maior para outra menor e isolada ou, para colonização; b) o modelo de ilhas, onde a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações bem definidas; c) o modelo de alpodras ou “stepping-stone”, onde as populações trocam migrantes entre populações vizinhas e d) o modelo de isolamento por distância, no qual o fluxo ocorre entre grupos vizinhos, em uma população contínua.

A importância do fluxo gênico está em contrapor os efeitos da deriva genética, podendo ser quantificado através de medidas diretas e indiretas. Slatkin (1985) apresenta resultados de diversos trabalhos com diferentes espécies e faz uma revisão dos métodos utilizados para estimar o fluxo de genes, discutindo os problemas e as pressuposições de cada um.

Os métodos diretos estimam o fluxo gênico contemporâneo e são baseados em observações no movimento dos vetores de pólen e sementes, na marcação do pólen e sementes, ou na identificação de alelos ou genótipos

migrantes, fazendo o uso de corantes, marcadores morfológicos e análise de paternidade. Os métodos indiretos estimam o fluxo gênico histórico e baseiam-se na distribuição da diversidade genética entre populações (Hamrick & Nason, 2000). Segundo Reis (1996a) os métodos indiretos fundamentam-se na relação entre a taxa de migração ( $m$ ) e a divergência entre populações, indicando uma relação inversa entre a divergência e a migração, considerando um modelo de ilhas.

Wright (1951) estabeleceu uma relação em que

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

onde:

$\hat{Nm}$  = número de migrantes por geração;

$F_{ST}$  = divergência genética entre populações.

Dessa forma, o valor de  $F_{ST}$  pode ser usado para estimar o  $\hat{Nm}$  e, conseqüentemente, o fluxo gênico. De acordo com Slatkin (1985), o  $F_{ST}$  obtido, segundo o modelo de ilhas, não requer nenhuma pressuposição sobre as causas das diferenças entre as subpopulações ou grupos. Slatkin & Barton (1989) consideram ainda que a utilização de estimativas de divergência genética para determinar o fluxo gênico é um método tão eficiente quanto outros métodos, mesmo quando o modelo de estrutura populacional é contínuo ou quando existem efeitos de seleção.

Wright (1951), baseando-se numa curva de distribuição de freqüências gênicas entre grupos de uma população, demonstra que se  $Nm$  é igual a 1 por geração, não haverá diferenciação genética significativa entre populações, ou seja, os efeitos da migração são suficientes para contrapor os efeitos da deriva.

As espécies arbóreas tropicais têm apresentado valores de  $N_m$  superiores a 1, das quais citamos *Euterpe edulis*, com  $\hat{N}_m$  igual a 10,7 (Reis, 1996b), *Genipa americana* com  $\hat{N}_m$  igual a 41,4 (Sebbenn, 1997) e *Xylopia emarginata*, cujo  $\hat{N}_m$  foi igual a 13,8 (Jaeger, 2004).

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. Em Hamrick & Nason (2000) encontram-se valores de diversidade e de fluxo gênico para diversas categorias de plantas.

## 2.8 Tamanho efetivo

O tamanho efetivo de uma população ( $N_e$ ) é o número de indivíduos que efetivamente participam na reprodução e que contribuem para a geração seguinte. Seu conceito e teoria foram desenvolvidos por Wright (1931) e Fisher (1941) e ele representa o tamanho de uma população que apresenta a mesma redução na variabilidade genética pela endogamia ou deriva de uma população de referência panmítica, de tamanho finito  $N$  (Crow & Kimura, 1970). O tamanho efetivo também refere-se à representatividade genética presente em uma amostra  $n$  de plantas, sementes ou propágulos (Vencovsky, 1987).

Em populações naturais ocorre a sobreposição de gerações, existindo indivíduos que ainda não atingiram a idade reprodutiva e outros que já a ultrapassaram. Para fins genéticos, os indivíduos destas duas categorias não contam para o tamanho efetivo da população (Robinson, 1998) e, portanto, muitas vezes o tamanho efetivo costuma ser inferior ao tamanho da população. Outros fatores contribuem para a redução desse tamanho, como o número

desigual de indivíduos masculinos e femininos, as diferenças de fertilidade entre eles, o assincronismo no florescimento (; Lande, 1988; Loveless & Hamrick, 1984). Além disso, o tamanho efetivo depende dos níveis de endogamia e parentesco existente na população e, portanto, quanto maiores estes níveis, menor é a representatividade genética dos indivíduos (Vencovsky, 1987).

O conhecimento do tamanho efetivo de uma ou mais populações é fundamental para conservação *in situ* de uma dada espécie, pois a partir dele podemos delimitar a área mínima que deverá ser mantida. Frankel & Soulé (1981) sugerem dois números de referência para o tamanho efetivo. Um  $N_e$  de 50 seria suficiente para conter os efeitos da endogamia nas populações, considerando 10 gerações, enquanto que um  $N_e$  de 500 considera ainda que a estocasticidade genética pode 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.

## **2.9 Sistema reprodutivo**

O sistema reprodutivo pode ser considerado como o fator mais influente na estrutura genética das populações (Loveless & Hamrick, 1984), pois é ele quem determina como as informações genéticas serão transferidas de uma geração para a outra (Wright 1921). A caracterização do sistema de cruzamento de uma espécie é fundamental para programas de melhoramento genético e de conservação, permitindo o delineamento de estratégias que otimizem a

amostragem da variabilidade genética e a adoção de modelos genéticos e estatísticos apropriados para a estimativa de seus parâmetros genéticos. As espécies alógamas mantêm a maior parte da sua variação genética dentro das suas populações, enquanto que, em espécies autóгамas, esta variação encontra-se entre populações (Hamrick & Godt, 1989). O sistema misto de reprodução, por sua vez, prediz variabilidade genética intermediária entre espécies de autofecundação e alógamas, sendo o potencial de diferenciação entre populações variável em função do balanço dessas duas formas de reprodução (Loveless & Hamrick, 1984).

As espécies arbóreas apresentam uma ampla variedade de sistema de reprodução, incluindo cruzamentos, autofecundação, apomixia e combinações entre estas. Estudos sobre o sistema reprodutivo de espécies arbóreas tropicais (Lacerda et al., 1999; Murawski et al., 1994; O'Malley & Bawa, 1987; Sebbenn, 2001), utilizando marcadores moleculares, mostram que a maioria das espécies são alógamas ou apresentam um sistema misto de cruzamento, com predominância de alogamia. Diversos fatores podem afetar o sistema reprodutivo de uma espécie tais como o tamanho e a densidade populacional (Franceschinelli & Bawa, 2000; Murawski & Hamrick, 1992), a sincronia no florescimento e os padrões fenológicos (Hall et al., 1996), o grau de estruturação genética nas populações (Franceschinelli & Bawa, 2000) e a presença de mecanismos de auto-incompatibilidade (Murawski & Hamrick, 1992).

O sistema reprodutivo das espécies arbóreas pode ser caracterizado basicamente por dois modelos: o modelo aleatório e o modelo misto de reprodução. O modelo aleatório é o modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg e de acordo com Sebbenn (2001), este modelo abstrai o problema essencial de transmissão das informações genéticas em populações, ou seja, como a distribuição das frequências gênicas surge de uma geração para outra. A pressuposição de cruzamentos aleatórios serve como um padrão de referência,



permitindo a comparação com os cruzamentos observados em populações experimentais (Clegg, 1980). Já o modelo misto de reprodução é o mais difundido para a avaliação do sistema de reprodução em plantas, a partir de dados de marcadores genéticos (Clegg, 1980) e ele divide o processo de reprodução em dois componentes: cruzamentos aleatórios e autofecundação (Clegg, 1980; Ritland & Jain, 1981). A taxa de cruzamento  $t$  pode ser estimada pela metodologia proposta por Ritland & Jain (1981), baseada no emprego de modelos multilocos.

## **2.10 Distribuição espacial dos genótipos**

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 (Kevin et al., 2004). 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 (Epperson, 1995; Heywood, 1991). Epperson & Allard (1989) consideram que a estrutura espacial dos genótipos em populações é parte integrante dos processos genéticos populacionais. De acordo com Sokal & Menozzi (1982), a estruturação espacial dos genótipos pode servir como indicativo de processos como migração, fluxo gênico, deriva genética e seleção e, ainda, influenciar a dinâmica da endogamia biparental e depressão endogâmica (Setsuko et al., 2004). A existência de estrutura genética espacial positiva, ou seja, de indivíduos aparentados localizados próximos dentro das populações, pode indicar ainda a ocorrência de cruzamentos endogâmicos (Sebbenn, 1997).

O conhecimento e entendimento da estrutura genética espacial ao nível populacional são cruciais para o manejo e conservação dos recursos genéticos (Kevin et al., 2004), já que a presença de estruturação genética pode influenciar padrões reprodutivos e evolucionários. Além disso, tal conhecimento é de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais, seja para fins de conservação ou melhoramento genético (Miyamoto et al., 2002), permitindo a obtenção de amostras representativas, podendo ainda minimizar o impacto das práticas de manejo na sustentabilidade dos recursos genéticos (Gandara, 1996).

A estrutura genética espacial, ou seja, a maneira como os genótipos estão distribuídos espacialmente numa população pode ser investigada utilizando a análise de autocorrelação espacial. Os métodos de autocorrelação foram desenvolvidos no início dos anos 50 (Moran, 1950 citado por Robinson, 1998) e estendidos para a biologia por Sokal & Oden (1978), podendo ser aplicados à genética como um procedimento exploratório (Robinson, 1998), procurando explicar padrões de heterogeneidade genética. Legendre (1993) define a autocorrelação espacial como a propriedade de variáveis assumirem valores, em pares de localidades, separadas por uma certa distância, mais similares (autocorrelação positiva) ou menos similares (autocorrelação negativa) do que seria esperado pela associação aleatória dos pares observados. A análise de autocorrelação espacial compreende um conjunto de procedimentos estatísticos delineados para detectar e quantificar a dependência em uma variável baseada em valores amostrados de localidades múltiplas, mapeadas em um espaço geográfico (Heywood, 1991). Em estudos de genética populacional, utilizando-se as frequências alélicas, a autocorrelação espacial é usualmente mensurada pelo índice I de Moran (Epperson & Chung, 2001; Kevin et al., 2004; Lacerda & Kageyama, 2003b). Os valores da variável devem ser correlacionados com pares de pontos em um plano; no entanto, nem todos os pares de pontos serão

relacionados, mas apenas aqueles considerados vizinhos (Sokal & Oden, 1978). Entre os métodos mais frequentemente utilizados para conectar os pares de localidades amostrais vizinhas, estão o algoritmo do vizinho mais próximo e a conexão de Gabriel (Heywood, 1991; Sokal & Oden, 1978).

A estrutura espacial dos genótipos também pode ser analisada a partir de estimativas de coeficientes de parentesco ou coeficientes de coancestralidade, baseados na probabilidade de identidade dos alelos em dois genes homólogos amostrados da mesma maneira. As estimativas de coancestria são definidas como probabilidade de identidade por descendência entre alelos (Ritland, 1996). A partir de dados de marcadores genéticos estima-se uma “coancestria relativa” que pode ser definida como a razão de diferenças de probabilidades de identidade por estado (Rousset, 2002). O índice I de Moran tem sido utilizado amplamente no estudo da distribuição espacial dos genótipos, mas, recentemente, muitos autores têm empregado os coeficientes de coancestralidade para analisar a estrutura genética espacial de espécies arbóreas (Loiselle et al., 1995; Miyamoto et al., 2002; Ruggiero et al., 2005). Tais coeficientes, além de informarem sobre a presença ou não de estruturação, indicam o grau de parentesco entre os indivíduos.

Em uma população existem limitações físicas que podem dificultar os cruzamentos aleatórios, devendo haver maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos mais próximos, o que, por sua vez, pode levar à formação de grupos, estruturando a população (Futuyma, 1992). Estudos sobre a estrutura intrapopulacional de espécies arbóreas têm demonstrado que a distribuição de alelos e genótipos não é aleatória dentro das populações. A existência de estruturação genética espacial foi observada em populações de *Ocotea odorifera* (Kageyama et al., 2003a), de *Eschweilera ovata* (Gusson, 2003), de *Shorea leprosula* e *Shorea ovalis* (Kevin et al., 2004) e de *Cryptocarya moschata* (Moraes et al., 2004). Por outro lado, há trabalhos envolvendo espécies arbóreas



tropicais que constataram a ausência de estruturação genética espacial, dos quais citamos estudos com *Platypodium elegans* (Hamrick et al., 1993), *Genipa americana* (Sebbenn, 1997), *Chorisia speciosa* (Souza, 1997), *Cedrela fissilis* (Póvoa, 2002), *Caryocar brasiliense* (Melo Júnior, 2003) e *Myracrodruon urundeuva* (Lacerda & Kageyama, 2003).

## **2.11 Marcadores moleculares no estudo de populações**

O sucesso de um programa de melhoramento, manejo ou conservação de uma espécie depende do conhecimento da quantidade de variação genética presente. Esse importante conhecimento pode ser obtido por meio de marcadores genéticos. Robinson (1998) define esses marcadores como sendo caracteres qualitativos com herança mendeliana simples, facilmente reconhecida e cuja expressão não é influenciada pelo meio ambiente.

Os primeiros marcadores utilizados foram os morfológicos, determinados por mutações simples em um gene particular, gerando alterações fenotípicas de fácil identificação. No entanto, devido às suas características (reduzido número de marcadores, dependência do desenvolvimento da planta, influência do ambiente) o uso desses marcadores ficou bastante limitado (Carvalho & Torres, 2002; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Na década de 50, a introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas revelou uma nova fonte de marcadores genéticos capazes de detectar a variabilidade de alelos de um loco codificador de uma proteína com função enzimática. Segundo Pinto et al. (2001) esta técnica contribuiu para avanços expressivos na área de genética de populações, revelando uma quantidade significativa de variação nos mais diferentes organismos. As isoenzimas são diferentes formas bioquímicas de uma enzima, com a mesma especificidade de substrato, que podem ser identificadas por migração e coloração em gel. As



isoenzimas podem ser controladas por um ou vários alelos, situados num mesmo loco, ou em diferentes locos (Alfenas et al., 1991) e são, em última análise, produto da expressão dos genes.

A técnica de isoenzimas consiste em três etapas: extração das enzimas do tecido vegetal, separação por eletroforese e coloração por métodos histoquímicos. O padrão de bandas visualizado no gel constitui o fenótipo eletroforético, que é interpretado, obtendo-se assim os genótipos dos indivíduos. A população de indivíduos é então analisada em termos de locos e alelos, para cada sistema enzimático. Para a interpretação dos padrões eletroforéticos, é necessário o conhecimento prévio sobre o número de subunidades que compõe a enzima (Carvalho & Torres, 2002; Pinto et al., 2001). A partir da leitura dos fenótipos eletroforéticos são estimadas as frequências alélicas e genotípicas, que permitem a avaliação da estrutura genética das populações analisadas, levando a conclusões sobre a magnitude e a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações, conseqüências evolutivas, diferenciação geográfica de populações dentro de espécies, fluxo gênico e taxas de cruzamento (Torggler et al., 1995).

Estudos realizados na década de 60 por Lewontin & Hubby (1966) sobre a estrutura genética populacional de *Drosophila pseudoobscura* contribuíram para a disseminação dessa técnica e, atualmente, esse tipo de marcador tem sido ainda muito utilizado no estudo de genética de populações, principalmente naqueles envolvendo espécies arbóreas tropicais (Melo Júnior et al., 2004; Oliveira et al., 2002; Ribas & Kageyama, 2004; Ribeiro & Lovato, 2004; Telles et al., 2003). Entre as principais vantagens dos marcadores enzimáticos estão a expressão codominante, permitindo a distinção entre homozigotos e heterozigotos e o custo relativamente mais baixo e acessível que dos marcadores de DNA, principalmente quando se trabalha com espécies arbóreas nativas, das quais poucas informações são conhecidas.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, resultando no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente. O surgimento da técnica da reação de polimerização em cadeia (PCR), na qual ocorre a síntese *in vitro* de milhões de cópias de DNA, promoveu o desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares. AFLPs, RAPDs, SCARs e microssatélites são exemplos de técnicas baseadas em PCR que abriram novas e inúmeras possibilidades de utilização do polimorfismo encontrado na molécula de DNA.

Os marcadores RAPD (Willians et al., 1990) baseiam-se na amplificação via PCR de segmentos aleatórios de DNA, através de iniciadores (“primers”) pequenos, com cerca de dez nucleotídeos, e de seqüência arbitrária com um conteúdo de G + C entre 50 e 70%. Os *primers* ligam-se às seqüências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação *in vitro* do segmento de DNA entre dois *primers* adjacentes, distanciados no máximo entre 3 a 4 mil pares de bases, na presença da enzima *Taq* polimerase e de nucleotídeos (Fritsh & Rieseberg, 1996). Essa técnica tornou-se muito popular, devido, principalmente, à sua acessibilidade tecnológica e seu baixo custo, podendo ser aplicada a um grande número de espécies. Além dessas, outras vantagens são oferecidas pelos marcadores RAPD, como a não utilização de radioatividade; não necessita do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada e, ainda, a pequena quantidade de DNA necessária. Lynch & Milligan (1994) consideram ainda que o uso desse tipo de marcador possibilita uma amostragem aleatória mais ampla do genoma do que aquelas proporcionadas por outras classes de marcadores.

No entanto, como o polimorfismo de RAPD está baseado em mutações ou rearranjos nos sítios de anelamentos dos “primers”, ele se caracteriza pela ausência ou presença de produtos amplificados, sendo, portanto, um marcador com padrão de segregação dominante, com o qual não é possível a distinção

entre homozigotos e heterozigotos (Kirst, 1999). Essa dominância limita as inferências estatísticas feitas com RAPDs, especialmente em organismos diplóides, e pode fornecer algum viés na estimativa de alguns parâmetros genéticos quando comparados com marcadores codominantes (Lynch & Milligan, 1994). A natureza dominante e binária dos marcadores RAPD tem limitado a análise da estrutura e diversidade em populações naturais, principalmente com relação às estimativas da diversidade genética, frequências genotípicas, verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e taxas de endogamia.

Modelos estatísticos foram desenvolvidos no sentido de contornar o problema da dominância (Excoffier et al., 1992; Clark & Lanigan, 1993; Lynch & Milligan, 1994). Em 1992, Excoffier et al. introduziram a estatística  $\phi$ , proporcionando uma nova alternativa para a análise dos dados obtidos por esses marcadores. Uma análise de variância que incorpora as informações sobre a divergência de DNA provenientes de dados de haplótipos, derivada de uma matriz de distâncias quadradas em todos os pares de haplótipos, foi desenvolvida por esses autores e é denominada análise de variância molecular (AMOVA). A AMOVA estima os componentes de variância análogos às estatísticas F, denominada estatística  $\phi$ , refletindo a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. A significância dos componentes de variância e das estatísticas  $\phi$  é testada por meio de permutações. A base dessa análise de variância molecular é que ela trata as distâncias genéticas como desvios da média de um grupo e usa os quadrados dos desvios como variâncias, permitindo a partição da variação genética entre e dentro das populações analisadas. Esta metodologia acomoda diferentes tipos de matrizes de entrada, fornecida por diversos tipos de marcadores moleculares, e diferentes tipos de pressuposições evolutivas sem modificar a estrutura básica da análise. De acordo com Excoffier et al. (1992) a AMOVA é facilmente aplicável em diferentes

situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para a análise de dados moleculares.

Além da questão estatística da análise dos dados obtidos por marcadores dominantes, uma outra limitação dos marcadores RAPD se refere à baixa repetibilidade de algumas bandas (Harris, 1999; Lacerda et al., 2002). No entanto, esta limitação pode ser contornada por meio da utilização de uma cuidadosa rotina laboratorial, evitando-se o máximo possível de variação nas diferentes etapas da técnica, procedendo uma criteriosa escolha dos primers e das bandas que serão utilizados (Bekessy et al., 2002; Palacios & Gonzáles-Candelas, 1997; Pérez et al., 1998). Huff et al. (1993) foram os primeiros a utilizar a análise de variância molecular para dados provenientes de marcadores RAPD no estudo da variação genética entre e dentro de populações naturais de *Buchloë dactyloides*. A partir daí, surgiram diversos trabalhos utilizando marcadores RAPD's na determinação dos níveis de variação genética entre e dentro de populações naturais de plantas e também para descrever parâmetros populacionais, tais como o fluxo de genes, o sistema de cruzamento, o tamanho efetivo e processos históricos que podem ter contribuído para estrutura genética dessas espécies. Na literatura encontram-se relatados inúmeros trabalhos envolvendo o uso de marcadores RAPD's no estudo da genética de populações e conservação genética de plantas. No caso de espécies arbóreas, esses estudos são encontrados para *Limonium dufourii* (Palacios & Gonzáles-Candelas, 1997), *Caesalpineia echinata* (Cardoso et al., 1998), *Plathymenia reticulata* (Lacerda et al., 2001), *Eugenia dysenterica* (Zucchi, 2002), *Trichilia pallida* (Zimback et al., 2004), *Aspidosperma polyneuron* (Torezan et al., 2005) e *Cedrus atlantica* (Renau-Morata et al., 2005), entre outros.

O índice de Shannon, inicialmente utilizado em estudos ecológicos para indicar a diversidade de espécies por área, foi introduzido em 1972 por Lewontin (Lewontin, 1972) nos estudos de genética de populações. A utilização



desse índice como medida de diversidade populacional é bastante interessante, especialmente quando se trabalha com dados RAPD, pois seu uso possibilita contornar o problema da não detecção dos genótipos heterozigotos, já que o índice de Shannon não se baseia na heterozigosidade da população e, sim, na frequência fenotípica da banda na população (Moura, 2003). Por isso, esse índice tem sido utilizado em diversos trabalhos para estudo da variabilidade genética com marcadores RAPD (Cardoso et al., 1998; Gillies et al., 1999; Renau-Morata et al., 2005; Yeh et al., 1995).

Por ser uma técnica acessível, de custo relativamente menor a outras técnicas que utilizam marcadores de DNA, como microssatélites e AFLPs, os marcadores RAPD's são considerados adequados para estimar a variabilidade genética em bancos de germoplasma, para estudos de estrutura genética de populações, estimativas de parâmetros genéticos, entre outros. Nymbom (2004) considera que o uso de marcadores dominantes para acessar a variabilidade genética entre indivíduos e populações, como o RAPD, é bastante promissor, pois muitos locos polimórficos podem ser obtidos de forma rápida e fácil, num espaço de tempo relativamente curto e sem o conhecimento prévio do genoma das espécies sob estudo. Lacerda et al. (2002) consideram que essa técnica mostra-se indicada para estudos envolvendo espécies ainda desconhecidas geneticamente, como é o caso da maioria das espécies arbóreas tropicais, permitindo a estimativa de importantes parâmetros genéticos em curto tempo. O conhecimento desses parâmetros é fundamental para um direcionamento adequado de programas de melhoramento, manejo e conservação genética, tornando-os realmente efetivos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização dos locais de estudo

O material genético utilizado para a realização deste estudo foi proveniente de cinco populações naturais de *Eremanthus erythropappus*, localizadas no Estado de Minas Gerais, como pode ser visto na Figura 2.

A população Morro do Pilar (MP) localiza-se na Fazenda Coelhos, na cidade de Morro do Pilar, MG. A cidade fica no centro do estado, localizada na Serra do Cipó, que, por sua vez, faz parte do Complexo do Espinhaço. O clima da Serra do Cipó é do tipo tropical de altitude com verões frescos e estação seca bem definida. As temperaturas médias anuais estão em torno de 21,2 °C, com precipitação média anual de 1.622 mm. A vegetação é variada, com alto grau de endemismo, composta por campos rupestres, campos cerrados e matas de galeria.

A população Carrancas (CR) está contida num fragmento de Floresta Semidecídua Alto-Montana, na Chapada das Perdizes, município de Carrancas, MG. Esta área é considerada uma das mais importantes para a conservação da biodiversidade no estado (Costa et al., 1998) e protege uma das nascentes do rio Capivari. Esta população localiza-se nas coordenadas 21°36'29''S e 44°36'38''W e a uma altitude que varia de 1.440 a 1.513 m. De acordo com Oliveira-Filho et al. (2004) os campos de altitude predominam no alto da chapada e estes encontram-se com a floresta ocupando um fundo de vale. O clima é do tipo Cwa de Köppen, com temperatura média anual de 14,8 °C e precipitação média anual de 1.483 mm.

As populações Baependi Mônica (BM) e Baependi Roberto (BR) localizam-se em Baependi, sul de Minas Gerais. O clima é mesotérmico úmido do tipo Cwb, tropical de altitude, com verões suaves. A temperatura média anual

varia entre 18 a 19 °C e a média anual de precipitação pluviométrica é de 1.400 mm. A área é caracterizada por vegetação do tipo campo cerrado, mata de galeria e floresta semi-decídua montana.

A população Poço Bonito (PB) localiza-se no Parque Estadual Quedas do Rio Bonito, situado ao sul do município de Lavras, MG, confrontando-se com o município de Ingaí, MG, nas coordenadas 21°19'45''S e 44°58'18''W. Está situado na região da Serra do Carrapato, que faz parte do complexo da Serra da Bocaina, e apresenta altitudes que variam de 950 a 1.200m. A área do parque é de 85,5 ha, e a vegetação é classificada por Oliveira-Filho & Fontes (2000) como Floresta Semidecídua Alto-Montana.

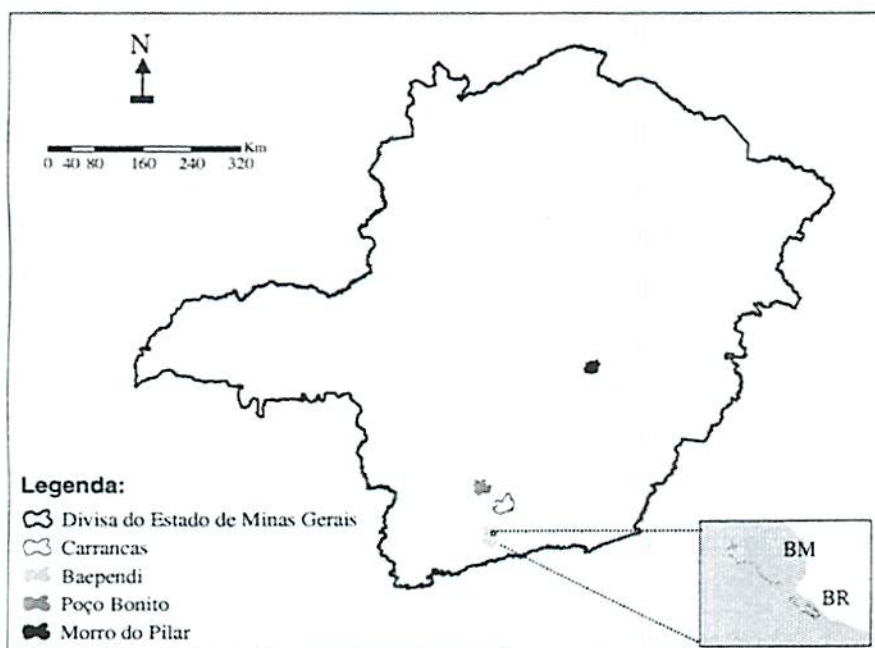


FIGURA 2. Localização das populações naturais de *Eremanthus erythropappus* avaliadas no presente estudo.



### **3.2 Amostragem dos indivíduos**

Em cada uma das cinco populações foram amostrados aleatoriamente 30 indivíduos adultos, com a distância mínima de 50 metros entre eles. Os indivíduos amostrados foram identificados e georeferenciados, utilizando-se o Sistema de Posicionamento Global (GPS), para posterior análise de autocorrelação espacial. A época das coletas variou de abril de 2002 a dezembro de 2003.

Foram coletadas amostras foliares de cada indivíduo. As folhas eram embaladas, identificadas e acondicionadas em caixa térmica com gelo para o transporte. Em laboratório, o material vegetal era armazenado em freezer -80°C, até o momento da extração.

Em duas populações, BM e PB, foram coletadas sementes de todos os indivíduos adultos (matrizes) para a análise das progênies. Para a produção das mudas foram utilizadas sementeiras e, após a germinação, que ocorreu em torno de duas semanas, as mudas foram selecionadas e mantidas no viveiro por cerca de 30 a 40 dias. Vinte matrizes, de cada uma das populações, produziram boas mudas para análise. De cada matriz, coletaram-se os tecidos foliares de 10 progênies, totalizando 200 progênies em cada população.

### **3.3 Extração das enzimas e análise eletroforética**

Para a extração das enzimas utilizou-se 200 mg de tecido foliar para 1 mL de solução extratora. Após alguns testes, definiu-se a solução extratora que melhor assegurou a integridade das enzimas (Tabela 3). Após a maceração, os extratos obtidos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Após a

centrifugação, 40 µL do sobrenadante, foram aplicados nas canaletas dos géis para proceder as corridas eletroforéticas.

TABELA 3. Solução utilizada para extração de enzimas em *Eremanthus erythropappus* (Alfenas et al., 1998).

| Componentes                 | Quantidade |
|-----------------------------|------------|
| Fosfato de sódio monobásico | 552 mg     |
| Sacarose                    | 7 g        |
| EDTA                        | 29 mg      |
| DTT                         | 46 mg      |
| L-ácido ascórbico; Na       | 99 mg      |
| Bissulfito de sódio         | 47 mg      |
| DIECA                       | 102 mg     |
| PVP-360                     | 50 mg      |
| β-mercaptoetanol            | 100 µl     |
| Albumina                    | 100 mg     |
| Água destilada              | 100 ml     |

A eletroforese foi conduzida em cuba vertical, utilizando-se géis de poliacrilamida como suporte. A concentração do gel de separação variou de 10 a 12,5%, de acordo com o sistema enzimático utilizado, buscando uma melhor visualização do padrão de bandas. O gel de concentração utilizado foi de 4%. Após a aplicação das amostras dos indivíduos no gel, conduzia-se a corrida eletroforética a uma temperatura de 4°C. A corrente elétrica aplicada era constante (10 mA por gel) e a corrida durava cerca de 3 horas e 30 minutos.

Foram testados 21 sistemas enzimáticos (Tabela 4) para *E. erythropappus* e, dentre estes, foram selecionados aqueles que apresentaram maior número de locos polimórficos e melhores padrões isoenzimáticos para interpretação.

TABELA 4. Sistemas enzimáticos testados para *Eremanthus erythropappus*, suas siglas e código das enzimas.

| Sistema Enzimático                 | Sigla         | EC       |
|------------------------------------|---------------|----------|
| Álcool desidrogenase               | ADH           | 1.1.1.1  |
| Diaforase                          | DIA           | 1.6.04.3 |
| Enzima málica                      | ME            | 1.1.1.4  |
| $\alpha$ - esterase                | $\alpha$ -EST | 3.1.1.1  |
| $\beta$ - esterase                 | $\beta$ -EST  | 3.1.1.1  |
| Fosfatase ácida                    | ACP           | 3.1.3.2  |
| Fosfatase alcalina                 | AKP           | 3.1.3.1  |
| Fosfogluco isomerase               | PGI           | 5.3.1.9  |
| Fosfoglucomutase                   | PGM           | 5.4.2.2  |
| 6-fosfogluconato desidrogenase     | 6PGDH         | 1.1.1.44 |
| Fumarase                           | FUM           | 4.2.1.2  |
| $\beta$ -galactose desidrogenase   | GLDH          | 1.1.1.48 |
| Glucose 6-fosfato desidrogenase    | G6PDH         | 1.1.1.49 |
| Glucose desidrogenase              | GDH           | 1.1.1.47 |
| Glutamato desidrogenase            | GTDH          | 1.4.1.3  |
| Glutamato oxaloacetato trasaminase | GOT           | 2.6.1.1  |
| Isocitrato desidrogenase           | IDH           | 1.1.1.42 |
| Leucina aminopeptidase             | LAP           | 3.4.11.1 |
| Malato desidrogenase               | MDH           | 1.1.1.37 |
| Peroxidase                         | PO            | 1.11.1.7 |
| Sorbitol desidrogenase             | SDH           | 1.1.1.14 |
| Superóxido dismutase               | SOD           | 1.15.1.1 |
| Xiquimato desidrogenase            | SKDH          | 1.1.1.25 |

EC – “Enzyme Commission”.

Após a corrida eletroforética, foram feitas as revelações de acordo com o sistema enzimático, segundo a metodologia de Brune et al. (1998), com algumas modificações. Após o aparecimento das bandas, estas foram fixadas em solução de glicerol 10% e, depois, os géis foram secos utilizando o conjunto Gel Dryer (modelo 583) e Vacunn Pump da Biorad.

As interpretações dos padrões eletroforéticos obtidos foram feitas no mesmo dia da corrida, logo após os géis terem sido colocados na solução de glicerol 10%, quando as bandas eram mais nítidas. Fez-se, então, a genotipagem

dos indivíduos de cada população e também das progênies, originando o zimograma de cada um. A identificação da zona codificadora dos locos e dos alelos foi feita a partir da região mais catódica para a mais anódica. Desta forma, o loco que mais migrou no gel foi denominado loco 1 e, dentro de cada loco, a banda que migrou mais era denominada alelo 1.

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 Extração do DNA genômico**

Para a extração do DNA genômico utilizou-se o método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987) com modificações. Utilizaram-se 200 mg de tecido foliar de cada indivíduo e 800  $\mu$ L do tampão de extração (100mM de Tris pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; 1% (p/v) PVP-40 e 0,2 % (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol) pré- aquecido a 65°C. O material foi macerado em almofariz, utilizando areia lavada e PVP insolúvel. Após a maceração, o material foi colocado em tubos Eppendorf de 2 mL, homogeneizado e colocado em banho-Maria por 60 minutos a 65°C, com agitações periódicas. A primeira extração dos ácidos nucléicos foi realizada com 600  $\mu$ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v), separando-se a fase orgânica da fase aquosa por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado, sendo transferido para novo tubo, no qual adicionaram-se 60  $\mu$ L de solução 10% (p/v) CTAB e 1,4 M NaCl. Após homogeneização, nova extração com 600  $\mu$ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v) foi feita e as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. A nova fase aquosa superior foi transferida para novo tubo,

adicionando-se 450  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado, para precipitar o DNA, ficando por 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70 %, por 10 minutos. Após nova centrifugação (10.000 rpm por 5 minutos), o etanol foi descartado e o *pellet* foi seco em temperatura ambiente. O DNA foi então ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de solução TE (1 mM Tris e 0,1 mM EDTA pH 8,0). A concentração de DNA de cada amostra foi quantificada em fluorímetro Hoeffler DQ 200. Com a concentração conhecida, o DNA de todas as amostras foi diluído a 10  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ , para as reações RAPD.

### **3.4.1 Condições de amplificação do DNA genômico**

Após a quantificação e diluição do DNA, as reações de amplificação foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700, num volume de 11  $\mu\text{L}$  contendo: 50 mM de Tris pH 8,3; 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de BSA; 0,4  $\mu\text{M}$  de primer (Operon Technologies); 0,2 mM dNTPs; 22 ng de DNA molde; 1 unidade de Taq polimerase e  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p.. As reações foram submetidas a 45 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. Cada ciclo constituiu-se de 15 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $42^{\circ}\text{C}$  e 30 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Ao final dos 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de 2 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ .

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose 1 %, utilizando o tampão de corrida TBE 1X. A voltagem aplicada foi de 50 V durante 140 minutos. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídio à concentração de 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

### 3.4.2 Seleção de *primers*

Foram testados *primers* dos kits N, O e X da Operon Technologies. Utilizaram-se duas plantas de cada população, totalizando 10 plantas para verificar o perfil de amplificação de cada *primer*. Os critérios utilizados para a escolha dos *primers* foi a maior produção e melhor resolução das bandas.

## 3.5 Análise estatística dos dados de isoenzimas

A interpretação dos zimogramas permitiu a determinação dos genótipos de cada indivíduo, possibilitando a estimativa de vários parâmetros genéticos.

### 3.5.1 Análise de segregação

O estudo do padrão de segregação em *E. erythropappus* foi realizado com base no método descrito por Gillet & Hattemer (1989), que compara o genótipo da árvore materna com a segregação de suas progênes de polinização aberta. Devem ser satisfeitas as seguintes condições: a) toda progênie de uma árvore materna  $A_iA_i$  de possuir o alelo  $A_i$  da árvore mãe; b) em casos de uma mãe heterozigota ( $A_iA_j, i \neq j$ ): i) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna,  $A_i$  ou  $A_j$ . ii) o número de progênes heterozigotas  $A_iA_j$  ( $N_{ij}$ ) deve ser igual à soma das progênes homozigotas  $A_iA_i$  ( $N_{ii}$ ) e  $A_jA_j$  ( $N_{jj}$ ),  $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ ; iii) o número de progênes heterozigotas  $A_iA_k$  ( $N_{ik}$ ) é esperado ser igual ao número de progênes heterozigotas heterozigotas  $A_jA_k$  ( $N_{jk}$ ),  $N_{ik} = N_{jk}$ , com  $k \neq i, j$ . Para esta

análise utilizaram-se as 10 plantas de cada uma das 20 progênies de polinização aberta, de duas populações, BM e PB.

Os fenótipos observados em cada progênie de árvores heterozigóticas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. A hipótese de segregação individual de cada progênie foi aceita ou descartada com base no teste de  $G$  padrão, com um grau de liberdade. Posteriormente, todos os testes  $G$  foram somados e um teste  $G$  total foi obtido ( $G_{Hipótese1:1}$ ). Os fenótipos observados, de progênies de árvores heterozigotas do mesmo genótipo materno, foram somados e um teste  $G$  agrupado foi obtido ( $G_{Agrupado}$ ). A hipótese nula desse teste é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de mesmo genótipo heterozigoto. A seguir, testou-se a hipótese de homogeneidade de segregação entre progênies, usando um teste  $G$  de homogeneidade ( $G_{Homogeneidade}$ ), obtido pela subtração do teste  $G_{Agrupado}$  do teste  $G_{Hipótese1:1}$ . Esses testes são aditivos, de forma que,  $G_{Hipótese1:1} = G_{Homogeneidade} + G_{Agrupado}$ , com  $n$  e  $n-1$  grau de liberdade, respectivamente (Sousa et al., 2002).

### 3.5.2 Análise do desequilíbrio de ligação

O teste de desequilíbrio de ligação entre pares de locos foi realizado com base na medida composta de Burrows ( $\Delta_{ij}$ ), de acordo com Weir (1979). Para a obtenção dessa estimativa, utilizou-se o programa POPGENE versão 1.32 (Young et al., 2000). A hipótese nula de desequilíbrio de ligação ( $\Delta_{ij} = 0$ ) foi testada com o teste de qui-quadrado ( $X^2$ ), descrito em Weir (1979).



### 3.5.3 Caracterização da variação genética intrapopulacional

A variação genética de cada população foi caracterizada pela estimativa das frequências alélicas e dos índices de diversidade. As frequências alélicas descrevem a variação para cada loco e suas estimativas foram obtidas pelo software BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989), por meio da contagem direta do número de alelos por loco, dividido pelo número de alelos no loco:

$$\hat{p}_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_j}$$

em que:

$p_{ij}$  - frequência do alelo  $i$  na população  $j$ ;

$n_{ij}$  - número de ocorrência do alelo  $i$  na população  $j$ ;

$n_j$  - número total de alelos amostrados na população  $j$ .

A partir das frequências alélicas foram obtidos os seguintes índices de diversidade genética: heterozigose média observada ( $\hat{H}_o$ ), heterozigose média esperada ( $\hat{H}_e$ ) de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, número efetivo médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}$ ). Esses índices foram obtidos utilizando o software BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989), com exceção do índice de fixação de Wright, obtido com o auxílio do software Genetics Data Analysis - GDA (Lewis & Zaykin, 1999).

A porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}$ ) foi obtida pela média aritmética do número de locos polimórficos pelo número total de locos. Considerou-se polimórfico o loco em que a frequência do alelo mais comum não

excedesse a 0,95, de acordo com Nei (1987), para amostras inferiores a 50 indivíduos.

O número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) fornece uma idéia da distribuição dos alelos nas diferentes populações estudadas. A estimativa do  $\hat{A}$ , em cada população, foi obtida pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos.

Para a verificação dos locos em equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizou-se o teste exato de Fisher. Segundo 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 em amostras moderadamente grandes, a existência de três alelos raros no loco resulta em números esperados pequenos e, nesses casos, os testes exatos são preferíveis.

A heterozigose observada ( $\hat{H}_o$ ) para cada loco foi obtida pela razão entre o número total de heterozigotos e o número de indivíduos. Para se obter a heterozigose média observada, as proporções obtidas para cada loco foram somadas e divididas pelo número total de locos polimórficos:

$$\hat{H}_o = 1 - \sum P_{ii}$$

em que:

$\hat{H}_o$  - estimativa da heterozigose observada;

$P_{ii}$  - frequência dos genótipos homozigotos.

A heterozigose esperada ( $\hat{H}_e$ ) para cada loco em uma dada população, foi obtida a partir das frequências alélicas, segundo frequências genotípicas esperadas, conforme equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com Nei (1987).

A heterozigose média foi obtida pela média aritmética entre todos os locos polimórficos analisados.

$$\hat{H}_e = \frac{2n(\sum p_i^2)}{(2n-1)}$$

em que:

$\hat{H}_e$  - estimativa da heterozigose esperada;

$N$  - número de indivíduos amostrados na população em questão;

$p_i^2$  - frequência alélica estimada do  $i$ -ésimo alelo.

O coeficiente  $f$  de Wright (1931), que mede a correlação entre os alelos nos gametas que formaram um zigoto, foi obtido por loco e pela média dos locos, a partir das seguintes relações:

$$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e} \text{ (locos)} \qquad \hat{f} = 1 - \frac{\sum \hat{H}_o}{\sum \hat{H}_e} \text{ (média dos locos)}$$

em que:

$f$  - estimativa do índice de fixação de Wright;

$\hat{H}_e$  - estimativa da heterozigose esperada;

$\hat{H}_o$  - estimativa da heterozigose observada.

Estes índices permitem acessar os níveis de fixações alélicas, informando o grau de endogamia dentro das populações.

### 3.5.4 Caracterização da estrutura genética das populações

A estrutura genética foi abordada a partir dos coeficientes de coancestralidade de Cockerham. Esta metodologia 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 são obtidos a partir da decomposição dos componentes de variação da análise de variância das freqüências alélicas. Como este modelo considera o processo amostral nas estimativas dos parâmetros, a análise de variância apresenta uma precisão maior (Reis, 1996b; Sebbenn, 1997).

A análise de variância, considerando os indivíduos adultos, baseou-se no seguinte modelo hierárquico de dois níveis:

$$Y_{ijk} = \mu + p_k + aj(k) + g_i(jk)$$

em que:

- $Y_{ijk}$  - freqüência do alelo  $i$  do indivíduo  $j$  da população  $k$ ;
- $\mu$  - média geral;
- $p_k$  - efeito da população  $k$ ;
- $aj(k)$  - efeito do indivíduo  $j$  dentro da população  $k$ ;
- $g_i(jk)$  - efeito do alelo  $i$  dentro do indivíduo  $j$  dentro da população  $k$ .

A partir das esperanças dos quadrados médios, demonstradas na Tabela 5, obtiveram-se as estimativas dos componentes de variância.

TABELA 5. Esquema de análise de variância das frequências alélicas, com as esperanças dos quadrados médios, E(QM) para os adultos de *Eremanthus erythropappus*.

| Fontes de variação           | Graus de liberdade | Quadrados Médios (QM) | Esperanças (QM)                            |
|------------------------------|--------------------|-----------------------|--|
| Entre populações             | P - 1              | QM <sub>P</sub>       | $\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2 + K_1\sigma_P^2$ |
| Indivíduos/populações        | 1 - P              | QM <sub>I</sub>       | $\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2$                 |
| Alelos/Indivíduos/Populações | G                  | QM <sub>G</sub>       | $\sigma_G^2$                               |
| Total                        | n - 1              |                       |  |

Assim, os componentes de variância foram obtidos da seguinte maneira:

$$\hat{\sigma}_G^2 = QM_G$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = \frac{QM_I - QM_G}{2}$$

$$\hat{\sigma}_P^2 = \frac{QM_P - QM_I}{K_1}$$

em que:

$K_1$  - corresponde ao coeficiente das variâncias entre populações

O significado genético desses componentes, estimados a partir de cada alelo, pode ser definido em termos de correlações intraclasse, ou coeficientes de coancestralidade, nos diferentes níveis de hierarquia. Assim, baseado em Cockerham (1969) e Weir (1996), tem-se que:

$$\hat{\sigma}_G^2 = \hat{p}(1 - \hat{p})(1 - \hat{F}_I)$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = \hat{p}(1 - \hat{p})(1 - \hat{\theta}_P)$$

$$\hat{\sigma}_P^2 = \hat{p}(1 - \hat{p})\hat{\theta}_P$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_P^2 = \hat{p}(1 - \hat{p})$$

em que:

- $\hat{p}$  - frequência alélica em um determinado loco;
- $\hat{F}$  - coeficiente médio de endogamia de todas as plantas nas populações analisadas;
- $\hat{\theta}_P$  - correlação entre as frequências alélicas de diferentes indivíduos da mesma população;

Dessa forma, a estimativa do coeficiente de coancestralidade foi obtida a partir dos componentes de variância:

$$\hat{\theta}_P = \frac{\hat{\sigma}_P^2}{\hat{\sigma}_T^2}$$

O coeficiente médio de endogamia de todas as plantas nas populações ( $\hat{F}$ ) foi estimado por meio da seguinte expressão:

$$\hat{F} = \frac{\hat{\sigma}_T^2 - \hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_T^2}$$

Vencovsky (1992) estendeu o modelo de Cockerham para abrigar um nível hierárquico intermediário de indivíduos dentro de famílias (progênies) dentro de populações, permitindo a estimativa da coancestralidade entre



indivíduos dentro de famílias. Na análise de variância, envolvendo as progênes, seguiu-se o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + f_k + aj(k) + g_i(jk)$$

em que:

$Y_{ijk}$  - frequência do alelo  $i$  do indivíduo  $j$  da progênie  $k$ ;

$\mu$  - média geral;

$f_k$  - efeito da progênie  $k$ ;

$aj(k)$  - efeito do indivíduo  $j$  dentro da progênie  $k$ ;

$g_i(jk)$  - efeito do alelo  $i$  dentro do indivíduo  $j$  dentro da progênie  $k$ .

As estimativas dos componentes de variância para as progênes foram obtidas pela decomposição das esperanças dos quadrados médios da análise de variância, conforme mostra a Tabela 6.

TABELA 6. Esquema de análise de variância das frequências alélicas, com as esperanças dos quadrados médios, E(QM) para as progênes de *Eremanthus erythropappus*.

| Fontes de variação           | Graus de liberdade | Quadrados Médios (QM) | Esperanças (QM)                          |
|------------------------------|--------------------|-----------------------|--|
| Entre progênes               | F - 1              | QM <sub>F</sub>       | $\sigma_G^2 + 2\sigma_1^2 + K_1\sigma^2$ |
| Indivíduos/progênes          | l - F              | QM <sub>l</sub>       | $\sigma_G^2 + 2\sigma_1^2$               |
| Alelos /Indivíduos/ progênes | G                  | QM <sub>G</sub>       | $\sigma_G^2$                             |
| Total                        | n - 1              |                       |  |

Assim, tem-se:

$$\hat{\sigma}_G^2 = QM_G$$

$$\sigma_i^2 = \frac{QM_i - QM_G}{2}$$

$$\sigma_F^2 = \frac{QM_F - QM_i}{K_1}$$

em que:

$K_1$  - Corresponde ao coeficiente das variâncias entre progênies

Baseado em Cockerham (1969) e Vencovsky (1992), esses componentes podem ser definidos em termos de coeficientes de coancestralidade, nos diferentes níveis de hierarquia. Assim, temos:

$$\hat{\sigma}_G^2 = \hat{p}(1-\hat{p})(1-\hat{F})$$

$$\hat{\sigma}_i^2 = \hat{p}(1-\hat{p})(1-\hat{\theta}_F)$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = \hat{p}(1-\hat{p})\hat{\theta}_F$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_i^2 + \hat{\sigma}_F^2 = \hat{p}(1-\hat{p})$$

em que:

$\hat{p}$  - frequência alélica em um determinado loco;

$\hat{F}$  - correlação entre alelos de plantas de diferentes progênies, ou coeficiente de endogamia de Wright;

$\hat{\theta}_F$  - coeficiente de parentesco ou coancestralidade das plantas dentro de mesma progênie;

As estimativas dos coeficientes de coancestralidade podem, assim, ser obtidas dos componentes de variância por:

$$\hat{\theta}_F = \frac{\hat{\sigma}_F^2}{\hat{\sigma}_T^2}$$

$$\hat{F} = \frac{\hat{\sigma}_T^2 - \hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_T^2}$$

$$\hat{f} = \frac{\hat{\sigma}_I^2}{\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2} = \frac{\hat{F} - \hat{\theta}_F}{1 - \hat{\theta}_F}$$

em que:

$\hat{f}$  - correlação entre alelos de plantas dentro de progênies ou coeficiente de endogamia dentro das progênies.

Para verificar se as estimativas médias de  $\hat{\theta}_p$ ,  $\hat{\theta}_F$ ,  $\hat{F}$  e  $\hat{f}$  eram diferentes de zero, foram estimados intervalos de confiança a 95% de probabilidade pelo método de reamostragem *bootstrap*, com 10.000 repetições sobre os locos. Para tal, empregou-se o programa GDA de Lewis & Zaykin (1999).

### 3.5.5 Estimativa do fluxo gênico

As estimativas de fluxo gênico entre as populações basearam-se na metodologia proposta por Wright (1951), que considera a quantidade de migrantes ( $N_m$ ) e a divergência genética entre populações ( $\hat{F}_{ST}$ ). Utilizou-se a equação proposta por Crow & Aoki (1984):

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

em que:

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

$n$  - número de populações

$\hat{N}m$  - número de migrantes

No entanto, Cockerham & Weir (1993) consideram que o emprego do  $\hat{\theta}_p$  como estimador da divergência entre populações é mais adequado, e por isso, ele foi utilizado, ao invés do  $\hat{F}_{ST}$ .

No caso do modelo de ilhas, o  $\hat{N}m$  mede o número de gametas que se movem, enquanto que, nos modelos contínuos, como o isolamento por distância, utiliza-se o  $\hat{N}_b$  que representa o tamanho de vizinhança ou a área onde ocorre panmixia. De acordo com Slatkin & Barton (1989), se assumirmos que a dispersão ocorre de forma homogênea ao redor de uma árvore, a área de vizinhança pode ser dada por:

$$\hat{N}_b = 2\pi\hat{N}m$$

### 3.5.6 Estimativa do tamanho efetivo

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). Com base em Vencovsky (1997), foram obtidas as estimativas de tamanho efetivo para cada uma das situações:

- a) Estimativa do  $\hat{N}_e$  para amostra de indivíduos adultos de uma simples população

$$\hat{N}_e = \frac{n}{1+f}$$

em que:

$n$  - número de indivíduos;

$f$  - coeficiente de endogamia médio da população.

- b) Estimativa do  $\hat{N}_e$  para progênes maternas de uma simples população

$$\hat{N}_e = \frac{0,5}{\hat{\theta}_F \left( \frac{1+C_f}{m} - \frac{1}{n} \right) + \frac{1+\hat{F}}{2n}}$$

em que:

$\hat{\theta}_F$  - coancestria entre indivíduos dentro de progênes ou divergência genética entre progênes;

$m$  - número de parentais ou progênes avaliadas;

$n$  - número total de indivíduos avaliados nas progênes;

$C_f$  - quadrado do coeficiente de variação do número de indivíduos avaliados nas progênes;

$\hat{F}$  - índice de fixação para o conjunto das progênes.

c) Estimativa do  $\hat{N}_e$  para várias populações

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

em que:

$\hat{\theta}_p$  - coancestria entre indivíduos dentro das populações ou divergência genética entre populações;

$p$  - número de populações avaliadas;

$n$  - número total de indivíduos avaliados nas populações;

$C_p$  - quadrado do coeficiente de variação de  $n_i$  sobre as populações;

$\hat{F}$  - índice de fixação para o conjunto das populações.

### 3.5.7 Caracterização do sistema reprodutivo

O sistema de reprodução de *Eremanthus erythropappus* foi analisado com base nos modelos de cruzamentos aleatórios, de cruzamentos mistos de Ritland & Jain (1981) e de cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989). O modelo de cruzamentos aleatórios foi avaliado pelo teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e pelo teste de homogeneidade entre as frequências alélicas de pólen e de óvulos. Para verificar a aderência dos dados ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizou-se o programa BIOSYS-1 (Swoford & Selander, 1989), que calcula o desvio da distribuição dos genótipos observados com relação aos esperados, segundo o EHW, fazendo o uso de três testes: a) o teste do qui-quadrado agrupado b) o qui-quadrado não agrupado e c) o teste exato de Fisher. Para separar os efeitos do sistema de reprodução (autofecundação, cruzamentos



entre aparentados ou preferenciais) dos fatores evolutivos (seleção, deriva genética, migração e mutação) utilizou-se o teste de Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW), de acordo com a Tabela 7. Este teste só foi realizado em locos que apresentaram desvios do EHW e, no mínimo três alelos, visto que, em locos com dois alelos não existem graus de liberdade suficientes (um grau de liberdade a mais é perdido na estimativa do coeficiente de endogamia). O teste de  $X^2$  para verificar a aderência dos genótipos observados aos esperados no EEW foi estimado conforme Vencovsky (1994):

$$X^2 = \sum (n_o - n_e) / n_e$$

em que:

$n_o$  - frequência genotípica observada;

$n_e$  - frequência genotípica esperada.

No teste de homogeneidade das frequências de pólen e óvulos, utilizou-se o  $\hat{F}_{ST}$  (Nei, 1977) como uma medida de divergência genética entre as frequências alélicas dos diferentes grupos, semelhante a outros trabalhos (Hall et al., 1994; Ribeiro & Lovato, 2004). Para testar a significância de  $\hat{F}_{ST}$ , para cada loco, aplicou-se o teste de qui-quadrado, conforme Workman & Niswander (1970):

$$X_c^2 = 2n\hat{F}_{ST}(k-1)$$

$$GL = (k-1)(s-1)$$

em que:

$n$  - número de indivíduos nos dois grupos;

$k$  - número de alelos;

$s$  - número de grupos.

TABELA 7. Frequências genótípicas esperadas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg e do Equilíbrio de Endogamia de Wright, para locos com três alelos.

| Genótipos | Frequências genótípicas esperadas |                                   |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|           | Equilíbrio de Hardy-Weinberg      | Equilíbrio de Endogamia de Wright |
| $A_1A_1$  | $p_1^2$                           | $p_1^2 + p_1(1 - p_1)f$           |
| $A_1A_2$  | $2p_1p_2$                         | $2p_1p_2(1 - f)$                  |
| $A_1A_3$  | $2p_1p_3$                         | $2p_1p_3(1 - f)$                  |
| $A_2A_2$  | $p_2^2$                           | $p_2^2 + p_2(1 - p_2)f$           |
| $A_2A_3$  | $2p_2p_3$                         | $2p_2p_3(1 - f)$                  |
| $A_3A_3$  | $p_3^2$                           | $p_3^2 + p_3(1 - p_3)f$           |

Fonte: Reis (1996b).

Para a análise do sistema reprodutivo de *Eremanthus erythropappus* de acordo com modelo de cruzamento misto de Ritland & Jain (1981), utilizou-se o programa “MLTR” de Ritland (1997). Esse modelo de cruzamento assume que as progênies resultam de uma mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundação e suas pressuposições básicas são:

1. cada evento de reprodução é o resultado de cruzamentos aleatórios (com probabilidade  $t$ ) ou de autofecundação (com probabilidade  $s$ );
2. a probabilidade de cruzamentos é independente do genótipo materno;
3. o conjunto de pólen é homogêneo para o cruzamento com todos os genótipos maternos;
4. os alelos de diferentes locos segregam de maneira independente;
5. os locos avaliados não sofreram mutação ou seleção entre o tempo de cruzamento e a análise.

A partir do programa foram estimados, para a população, a taxa de cruzamento multilocos ( $\hat{t}_m$ ), pelo método da máxima verossimilhança, a taxa de cruzamentos unilocos ( $\hat{t}_s$ ), a taxa de cruzamento entre aparentados ( $\hat{t}_p = \hat{t}_m - \hat{t}_s$ ), as frequências alélicas do óvulo e pólen ( $o$  e  $p$ ), também pelo método da máxima verossimilhança, a taxa de cruzamento por árvore materna, a proporção de autofecundação ( $\hat{s} = 1 - \hat{t}_m$ ), a correlação de autofecundação entre dois irmãos ( $\hat{r}_s$ ) e a correlação de paternidade entre dois irmãos ( $\hat{r}_p$ ). Para estimar o erro padrão da média para todos os parâmetros, o programa utilizou o procedimento de amostragem *bootstrap*, com 1.000 reamostragens, com base em Vencovsky (1997). Para a taxa de cruzamento individual por árvore materna, a unidade de amostragem foram as plantas dentro das matrizes e matrizes para a taxa de cruzamento média das populações.

### 3.5.8 Distribuição espacial dos genótipos

A análise da estrutura espacial dos genótipos foi realizada dentro de cada uma das populações de *E. erythropappus*. Estimou-se o coeficiente de coancestria  $\hat{\theta}_{xy}$  entre pares de indivíduos para 10 classes de distância, usando o coeficiente de coancestria proposto por Ritland (1996). Para a estimativa  $\hat{\theta}_{xy}$  empregou-se o programa SPAGeDi versão 1.1 (Hardy & Vekemans, 2003). O erro padrão da média das estimativas foi obtido por reamostragem *jackknife* entre locos 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 caracterização da estrutura espacial também foi efetuada pelo Índice I de Moran, de acordo com Sokal & Oden (1978), o qual pode assumir valores entre  $-1$  e  $+1$ , sendo que  $-1$  significa que os indivíduos pareados são completamente diferentes, e o valor  $+1$  significa que os indivíduos pareados são idênticos. O valor zero significa ausência de autocorrelação, isto é, os indivíduos estão distribuídos no espaço de forma aleatória. O índice de Moran é calculado para uma dada classe de distância  $s_q$ . Para cada alelo, o índice  $\hat{I}_q$  é calculado da seguinte forma:

$$I_q = \frac{n \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n w_{ij} (a_i - \bar{a})(a_j - \bar{a})}{W \sum_{i=1}^n (a_i - \bar{a})^2} \quad W = \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n w_{ij}$$

em que:

- $n$  - número total da amostra;
- $w_{ij}$  - pesos utilizados na comparação dos pontos, sendo  $w_{ij} = 1$  se os indivíduos  $i$  e  $j$  pertencem ao intervalo  $s_q$ ; do contrário,  $w_{ij} = 0$ .
- $a_i$  - Peso dado ao indivíduo  $i$  ( $x_i = 1, 0, 0,5$  ou  $0$ )
- $a_j$  - Peso dado ao indivíduo  $j$  ( $x_j = 1, 0, 0,5$  ou  $0$ )
- $W$  - Soma de todos os pesos

Os valores estimados do índice I de Moran foram usados para testar a significância dos desvios dos valores esperados,  $E(I) = -1/(n-1)$ , sobre a hipótese de nulidade de distribuição aleatória (Cliff & Ord, 1981). Para análise de autocorrelação espacial, utilizou-se o software SGS (Degen, 2001), obtendo-

se o correlograma da média entre locos e seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

### 3.6 Análise estatística dos dados RAPD

A partir da leitura criteriosa dos géis foi gerada uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto a presença (1) ou ausência de bandas (0). As bandas que apresentaram coloração fraca e baixa definição foram descartadas. Um loco foi considerado polimórfico para a população quando, pelo menos, dois indivíduos foram diferentes em relação aos demais, considerando a presença ou ausência de bandas. A porcentagem de polimorfismo obtido com cada *primer* utilizado, através da fórmula:

$$P = \frac{nbp}{nbt}$$

em que:

$P$  - porcentagem de polimorfismo;

$Nbp$  - número de bandas polimórficas;

$Nbt$  - número de bandas total.

O programa NTSYS – PC 2.0 (Rohlf, 1992) foi utilizado para estimar a similaridade entre os genótipos. O cálculo de similaridade entre os indivíduos foi realizado utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, conforme a expressão abaixo:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

em que:

- a* - número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente;
- b* - número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *i*;
- c* - número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *j*.

A partir dos índices de similaridade entre os indivíduos de cada população obteve-se uma matriz de similaridade. A representação simplificada das similaridades foi feita pela construção de dendrogramas para cada população. Os dendrogramas foram definidos pelo critério de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Mean Analysis) utilizando a rotina SAHN (Sequential Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering).

Para a análise do intrapopulacional e também para o conjunto das populações de *E. erythropappus* foi utilizado o software POPGENE versão 1.32 (Young et al., 2000), utilizando parâmetros para dados diplóides dominantes. Foram estimados o número de alelos observados ( $n_a$ ), o número de alelos efetivos ( $n_e$ ), a diversidade gênica de Nei (1973) ( $\hat{H}_c$ ) e o índice de Shannon ( $H_o$ ).

Os estudos que utilizam marcadores RAPD para estimar as frequências alélicas *p* e *q* a partir da raiz quadrada da frequência dos homocigotos nulos ( $q^2$ ) devem assumir que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Aagaard et al., 1998; Morden & Loeffler, 1999). Entretanto, para as espécies que apresentam algum grau de endogamia ou autofecundação, essa pressuposição nem sempre é verdadeira e pode levar a estimativas enviesadas, especialmente quando estas se baseiam em amostras de pequeno tamanho (Haig et al., 1994; Lynch & Milligan, 1994). Como o índice de Shannon baseia-se na frequência fenotípica da banda na população, a pressuposição de equilíbrio de



Hardy-Weinberg não se faz necessária. Dessa maneira, o grau de diversidade dentro de cada população foi quantificado pelo Índice de Shannon, além do  $\hat{H}_e$  de Nei (1973). O índice de Shannon da diversidade fenotípica ( $H_o$ ) é dado pela seguinte expressão:

$$\hat{H}_o = -\sum p_i \log_2 p_i$$

em que:

$p_i$  - frequência da presença ou ausência de banda.

A diversidade média das populações é representada por  $\hat{H}_{pop}$ , calculada pela média dos valores de  $\hat{H}_o$ . A diversidade total para a espécie ( $\hat{H}_{sp}$ ) é dada por:

$$\hat{H}_{sp} = -\sum p \log_2 p$$

em que:

$p$  - frequência média da presença ou ausência de banda considerando todos os indivíduos amostrados.

Para inferir sobre a estrutura genética das populações, foi realizada a análise de variância de dados moleculares – AMOVA (Excoffier et al., 1992), realizada através da decomposição total nas suas componentes entre e dentro de populações (Tabela 8). Semelhante ao índice de Shannon, a AMOVA não necessita da pressuposição de EHW, o que é vantajoso. Essa análise utilizou as distâncias genéticas ao quadrado, com o auxílio do programa ARLEQUIM (Schneider et al., 2000), que foram obtidas conforme Nei & Li (1979):

$$D = \{\delta_{xy}^2\} = 100 \left[ 1 - \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} \right]$$

em que:

$n_x$  e  $n_y$  - números de marcadores observados em indivíduos x e y, respectivamente;

$2n_{xy}$  - número de marcas existentes em ambos indivíduos.

Para cada par de populações foi calculado uma medida análoga ao  $F_{ST}$  de Wright (1951), simbolizada por  $\phi_{ST}$ . O número de migrantes foi estimado de maneira indireta, pela expressão  $\hat{N}_m = 0,25(1/\hat{\phi}_{ST} - 1)$ .

TABELA 8. Esquema da análise de variância molecular (AMOVA).

| Fonte de variação | GL      | SQ     | QM     | E(QM)                      |
|-------------------|---------|--------|--------|----------------------------|
| Entre populações  | $P - 1$ | $SQ_a$ | $QM_a$ | $n\sigma_a^2 + \sigma_b^2$ |
| Dentro populações | $N - P$ | $SQ_b$ | $QM_b$ | $\sigma_b^2$               |
| Total             | $N-1$   | $SQ_T$ |        | $\sigma_T^2$               |

(Fonte: Schneider et al., 2000).

onde  $n$  e  $\phi_{ST}$  são definidos por

$$n = \frac{N - \sum_P \frac{N_p^2}{N}}{P - 1}$$

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

em que:

- $N$  - número total de indivíduos para os dados genotípicos;
- $P$  - número total de populações;
- $N_p$  - número de indivíduos na população  $p$  para os dados genotípicos;
- $\phi_{ST}$  - proporção da variabilidade molecular de haplótipos entre populações.

Os parâmetros  $\sigma_a^2$  e  $\phi_{ST}$  foram testados por meio de 1.000 permutações dos haplótipos entre populações.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Sistemas enzimáticos

Dos 22 sistemas enzimáticos testados para *E. erythropappus*, 18 apresentaram atividade, enquanto que quatro sistemas – Fumarase (FUM), diaforase (DIA), Superóxido Dismutase (SOD) e Enzima Málica (ME) – não apresentaram atividade enzimática. Dez sistemas foram selecionados para o estudo da espécie, em função da resolução do padrão de bandas e também do número de locos presentes. A Figura 3 apresenta alguns padrões isoenzimáticos obtidos para *E. erythropappus*.

Na análise dos indivíduos adultos, os dez sistemas isoenzimáticos utilizados revelaram 38 zonas de atividade, sendo 21 passíveis de interpretação. A maioria dos estudos com espécies florestais, utilizando dados de marcadores genéticos, tem usado de 5 a 30 locos. De acordo com Ayala & Kinger (1984) a utilização de pelo menos 20 locos proporcionam estimativas confiáveis dos índices de diversidade e medidas de estrutura genética. As enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase apresentaram cinco zonas de atividade, sendo três locos descartados por problemas de interpretação. Destes dois locos analisados, o mais anódico apresentou enzima com estrutura monomérica e três alelos. O mais catódico também apresentou expressão monomérica, porém com dois alelos. A ACP apresentou três zonas de atividade, sendo um loco monomórfico e apenas uma, com dois alelos e composta por enzima monomérica, permitiu a interpretação. As enzimas GDH, MDH e ADH apresentaram quatro zonas de atividade cada uma, com bandas acromáticas, sendo as duas mais anódicas utilizadas no estudo, com dois alelos cada e expressão monomérica. A GOT apresentou apenas um loco, polimórfico com dois alelos e expressão monomérica. Para as enzimas SDH e GLDH foi possível identificar quatro zonas de atividade, porém apenas

três foram utilizadas na análise, todas monoméricas e com dois alelos cada. A GTDH apresentou quatro zonas de atividade, sendo uma delas descartada devido à baixa resolução das bandas. Dos três locos analisados, todos apresentaram enzima monomérica, com dois alelos, sendo que o mais catódico apresentou bandas cromáticas, enquanto que os dois mais anódicos apresentaram bandas acromáticas.

A análise genética das progênies de Baependi (BM) foi realizada utilizando-se 18 locos polimórficos, distribuídos em dez sistemas enzimáticos, enquanto que, na análise das progênies de Poço Bonito (PB), utilizaram-se onze locos polimórficos, obtidos em nove sistemas enzimáticos. Os padrões de bandas e as interpretações foram as mesmas dos indivíduos adultos, apenas descartando os locos que apresentaram muitas falhas, instabilidade e dificuldades na interpretação.

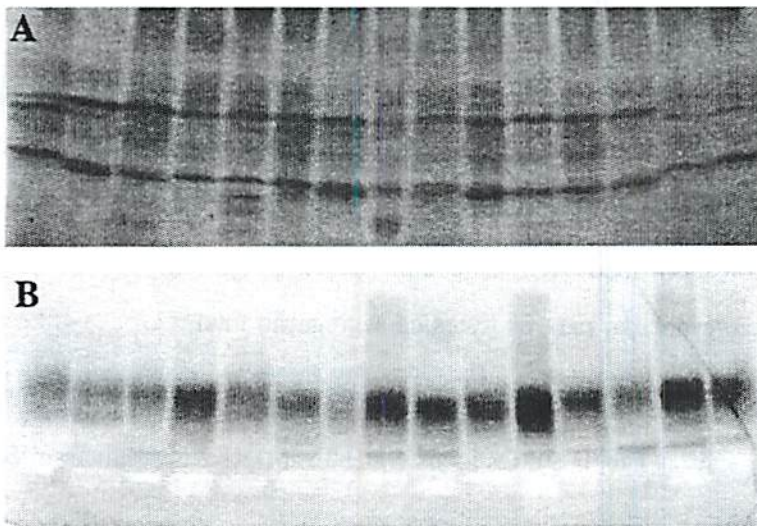


FIGURA 3. Amostras de géis de diferentes sistemas isoenzimáticos utilizados para a análise genética de *Eremanthus erythropappus*. A: revelação para enzima  $\beta$ -esterase. B: revelação para enzima MDH.

## 4.2 Padrões de segregação

Em estudos de sistema reprodutivo, é desejável o conhecimento dos padrões de segregação, confirmando a herança genética mendeliana dos marcadores isoenzimáticos (Lewandowski, 2000; Sebbenn, 2004), pois a todos os modelos adotados na genética de populações assume uma segregação meiótica regular nos locos, ausência de seleção e fertilização aleatória dos gametas.

Foram detectados poucos indícios de heterogeneidade de segregação entre as progênes de árvores heterozigóticas de mesmo genótipo materno. Somente os locos GDH-1 e MDH-2 da população BM (Tabela 9) e os locos  $\alpha$ -EST-1 e GDH-1 da população PB (Tabela 10) apresentaram desvios significativos para o teste  $G_{Homogeneidade}$ . Estes resultados indicam que para a maior parte dos locos avaliados, nas populações BM e PB, a segregação é homogênea entre progênes de diferentes árvores de mesmo genótipo materno. Nas progênes da população BM, apenas quatro dos dezoito locos avaliados apresentaram desvios da segregação. O loco  $\alpha$ -EST-2 apresentou desvio significativo da hipótese 1:1 no teste  $G_{Agrupado:1:1}$ , devido ao excesso de homozigotos. O loco ACP-1 revelou desvios significativos do padrão de segregação esperada, para os testes de segregação total ( $G_{Hipótese:1:1}$ ) e agrupado  $G_{Agrupado:1:1}$ , devido ao excesso de heterozigotos, evidenciado pela relação  $N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$  (Tabela 9). Os locos GDH-1 e MDH-2 apresentaram desvios da segregação 1:1 nos testes  $G_{Hipótese:1:1}$  e  $G_{Homogeneidade}$ . No entanto, todos os locos acima mencionados revelaram ausência de desvios significativos, em todos os testes  $G$ , quando as árvores da população BM com desvios da segregação 1:1 (Tabela 11) foram excluídas da análise, como pode ser vista na Tabela 9. Nas



progênies da população PB cinco dos onze locos avaliados apresentaram algum desvio nos testes  $G$ . O loco ADH-1 apresentou desvios significativos da segregação na análise agrupada ( $G_{Agrupado1:1}$ ), devido ao excesso de heterozigotos. No entanto, quando a árvore que apresentou desvios significativos (Tabela 11) foi excluída da análise, o loco adequou-se ao referido teste. Os locos GOT-1,  $\beta$ -EST-1,  $\alpha$ -EST-1 e GDH-1 apresentaram desvios significativos da razão de segregação 1:1 para a hipótese total ( $G_{Hipótese1:1}$ ) e agrupado ( $G_{Agrupado1:1}$ ), sendo que os dois últimos locos também apresentaram heterogeneidade na segregação em progênies de diferentes árvores para o mesmo genótipo materno. A relação  $N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$  apresentada na Tabela 10 mostra que os desvios significativos da segregação 1:1 ocorreram devido ao excesso de homozigotos nos locos  $\alpha$ -EST-1 e  $\beta$ -EST-1 e ao excesso de heterozigotos nos locos GOT-1 e GDH-1. No entanto, quando as árvores com desvios da segregação (Tabela 11) foram retiradas das análises, os locos ajustaram-se ao modelo de segregação 1:1, conforme a Tabela 10.

Os desvios da razão de segregação 1:1 observados nos locos isoenzimáticos de *E. erythropappus* podem ser atribuídos a distorções meióticas, interações alélicas, presença de alelos nulos, ligações entre locos, controle das isoenzimas por mais de um loco, erros amostrais e, até mesmo, a erros de interpretação dos géis (Cheliak & Pitel, 1985; Gillet & Hattemer, 1989). Diversos estudos de herança isoenzimática de espécies arbóreas têm observado desvios da segregação meiótica 1:1. A maior parte desses estudos refere-se à espécies arbóreas temperadas (Huang et al., 1994; Lewandowski, 2000; Wang & Lin, 1998). Recentemente, algumas espécies arbóreas tropicais passaram a ser contempladas com esses estudos, como por exemplo *Araucaria angustifolia* (Sousa et al., 2002), *Genipa americana* (Sebbenn, 2004), *Esenbeckia leiocarpa* (Seoane & Sebbenn, 2004) e *Trema micrantha* (Ribas & Sebbenn, 2004). Os

resultados obtidos nesse estudo confirmam a herança mendeliana simples para todos os locos isoenzimáticos avaliados em *E. erythropappus*. No entanto, o número de indivíduos por progênies, avaliado nesse estudo, pode ser considerado baixo, pois, segundo Sebbenn (2004), é interessante trabalhar com 50 indivíduos por progênies, quando o objetivo é verificar se há desvios da hipótese de segregação 1:1. Desta maneira, estudos mais consistentes podem ser realizados utilizando maior número de árvores matrizes ou maiores tamanhos de progênies.

TABELA 9. Teste para a hipótese de segregação regular de marcadores isoenzimáticos em progênies de *Eremanthus erythropappus* provenientes da população BM.

| Loco            | Genótipo materno              | Número árvores(n) | $N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$ | $\sum G_{Hipotese:1}$<br>$GL = n$ | $G_{Homogeneidade}$<br>$GL = n - 1$ | $G_{Agrupado:1}$<br>$GL = n$ | Árvores com desvio segregação |   |
|-----------------|-------------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---|
| $\alpha$ -EST-1 | A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> | a                 | 2                          | 7 : 14                            | 3,29                                | 0,91                         | 2,38                          |   |
| $\alpha$ -EST-2 | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 2                          | 5 : 15                            | 5,41                                | 0,17                         | 5,23*                         | 1 |
|                 |                               | b                 | 1                          | 3 : 7                             | 1,65                                | 0                            | 1,65                          |   |
| $\beta$ -EST-1  | A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> | a                 | 3                          | 12 : 18                           | 2,05                                | 0,84                         | 1,21                          |   |
| GOT-1           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 8                          | 43 : 33                           | 14,51                               | 13,19                        | 1,32                          |   |
| ACP-1           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 8                          | 58 : 21                           | 25,66**                             | 7,63                         | 18,03**                       | 4 |
|                 |                               | b                 | 4                          | 26 : 14                           | 7,65                                | 3,99                         | 3,66                          |   |
| SDH-1           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 12                         | 71 : 47                           | 15,54                               | 10,62                        | 4,92*                         | 1 |
|                 |                               | b                 | 11                         | 62 : 46                           | 8,17                                | 5,80                         | 2,38                          |   |
| SDH-2           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 10                         | 39 : 52                           | 8,72                                | 6,86                         | 1,86                          |   |
| GDH-1           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 12                         | 58 : 67                           | 23,75*                              | 23,24*                       | 0,51                          | 1 |
|                 |                               | b                 | 11                         | 58 : 58                           | 16,39                               | 16,39                        | 0,00                          |   |
| GDH-2           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 10                         | 51 : 45                           | 7,21                                | 0,38                         | 6,83                          |   |
| GTDH-1          | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 17                         | 79 : 80                           | 20,58                               | 20,58                        | 0,01                          |   |
| GTDH-2          | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 13                         | 60 : 63                           | 16,33                               | 16,26                        | 0,07                          |   |
| GLDH-1          | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 15                         | 79 : 66                           | 16,90                               | 15,73                        | 1,17                          |   |
| GTDH-2          | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 12                         | 57 : 61                           | 12,37                               | 12,24                        | 0,14                          |   |
| MDH-1           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 11                         | 53 : 49                           | 13,02                               | 12,86                        | 0,16                          |   |
| MDH-2           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 10                         | 44 : 50                           | 24,84*                              | 24,46*                       | 0,38                          | 2 |
|                 |                               | b                 | 8                          | 34 : 42                           | 12,42                               | 11,57                        | 0,84                          |   |
| ADH-1           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 8                          | 44 : 31                           | 12,75                               | 10,48                        | 2,26                          |   |
| ADH-2           | A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | a                 | 12                         | 57 : 60                           | 6,55                                | 6,47                         | 0,08                          |   |

$N_{ij}$  e  $N_{ii} + N_{jj}$  são números observados de genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente. a: inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco. b: exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco. (\*)  $P < 0,05$ . (\*\*)  $P < 0,01$ .

TABELA 10. Teste para a hipótese de segregação regular de marcadores isoenzimáticos em progênes de *Eremanthus erythropappus* provenientes da população PB.

| Loco    | Genótipo materno |   | Número árvores(n) | $N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$ | $\sum G_{Hipótese 1:1}$<br>$GL = n$ | $G_{Homogeneidade}$<br>$GL = n - 1$ | $G_{Agrupado 1:1}$<br>$GL = n$ | Árvores com desvio segregação |
|---------|------------------|---|-------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| α-EST-1 | $A_1 A_1$        | a | 3                 | 7 : 18                     | 16,27**                             | 11,94**                             | 4,33*                          | 1                             |
|         |                  | b | 2                 | 7 : 12                     | 3,50                                | 0,78                                | 2,72                           |                               |
| α-EST-2 | $A_1 A_2$        | a | 4                 | 9 : 18                     | 8,21                                | 5,15                                | 3,06                           | 2                             |
|         |                  | b | 6                 | 35 : 22                    | 4,31                                | 1,32                                | 2,99                           |                               |
| GOT-1   | $A_1 A_2$        | a | 8                 | 54 : 23                    | 21,24*                              | 8,40                                | 12,84**                        | 2                             |
|         |                  | b | 6                 | 35 : 22                    | 4,31                                | 1,32                                | 2,99                           |                               |
| β-EST-1 | $A_2 A_3$        | a | 5                 | 11 : 31                    | 17,85**                             | 6,60                                | 11,25**                        | 2                             |
|         |                  | b | 3                 | 9 : 13                     | 5,90                                | 3,84                                | 2,06                           |                               |
| β-EST-2 | $A_1 A_2$        | a | 11                | 39 : 33                    | 7,12                                | 6,62                                | 0,50                           |                               |
| ACP-1   | $A_1 A_2$        | a | 7                 | 42 : 26                    | 10,89                               | 7,09                                | 3,80                           |                               |
| SDH-1   | $A_1 A_2$        | a | 11                | 60 : 45                    | 18,99                               | 16,84                               | 2,15                           |                               |
| GDH-1   | $A_1 A_2$        | a | 16                | 103 : 74                   | 39,16**                             | 34,38**                             | 4,77*                          | 2                             |
|         |                  | b | 14                | 75 : 72                    | 7,58                                | 7,52                                | 0,06                           |                               |
| GTDH-1  | $A_1 A_2$        | a | 15                | 71 : 62                    | 8,27                                | 7,66                                | 0,61                           |                               |
| MDH-1   | $A_1 A_2$        |   | 10                | 42 : 50                    | 16,00                               | 15,30                               | 0,70                           |                               |
| ADH-1   | $A_1 A_2$        | a | 13                | 81 : 54                    | 16,63                               | 11,19                               | 5,44*                          | 1                             |
|         |                  | b | 12                | 71 : 53                    | 11,24                               | 8,62                                | 2,62                           |                               |

$N_{ij}$  e  $N_{ii} + N_{jj}$  são números observados de genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

a: inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco.

b: exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(\*)  $P < 0,05$ . (\*\*)  $P < 0,01$ .

TABELA 11. Árvores de *Eremanthus erythropappus* que apresentaram desvios significativos no teste  $G$  para a segregação meiótica 1:1.

| População PB<br>Loco/número da árvore | Genótipo materno | $N_{ij}$ | $N_{ii} + N_{jj}$ | $G$<br>GL = 1 |
|---------------------------------------|------------------|----------|-------------------|---------------|
| $\alpha$ -EST-1                       |                  |          |                   |               |
| 2                                     | $A_2A_3$         | 0        | 6                 | 5,54 *        |
| $\beta$ -EST-1                        |                  |          |                   |               |
| 20                                    | $A_2A_3$         | 1        | 9                 | 7,36**        |
| 23                                    | $A_2A_3$         | 1        | 9                 | 7,36**        |
| GOT-1                                 |                  |          |                   |               |
| 17                                    | $A_1A_2$         | 1        | 9                 | 7,36*         |
| 25                                    | $A_1A_2$         | 1        | 9                 | 7,36*         |
| GDH-1                                 |                  |          |                   |               |
| 10                                    | $A_1A_2$         | 10       | 0                 | 13,86**       |
| 20                                    | $A_1A_2$         | 10       | 0                 | 13,86**       |
| ADH-1                                 |                  |          |                   |               |
| 20                                    | $A_1A_2$         | 8        | 2                 | 3,85*         |
| População BM<br>Loco/número da árvore | Genótipo materno | $N_{ij}$ | $N_{ii} + N_{jj}$ | $G$<br>GL = 1 |
| ACP-1                                 |                  |          |                   |               |
| 23                                    | $A_1A_2$         | 9        | 1                 | 7,36*         |
| SDH-1                                 |                  |          |                   |               |
| 11                                    | $A_1A_2$         | 9        | 1                 | 7,36*         |
| GDH-1                                 |                  |          |                   |               |
| 1                                     | $A_1A_2$         | 1        | 9                 | 7,36*         |
| MDH-2                                 |                  |          |                   |               |
| 15                                    | $A_1A_2$         | 1        | 9                 | 7,36*         |
| 22                                    | $A_1A_2$         | 1        | 7                 | 5,06*         |

$N_{ij}$  e  $N_{ii} + N_{jj}$  são os números observados dos genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

(\*)  $P < 0,050$ . (\*\*)  $P < 0,010$ .

### 4.3 Desequilíbrio de ligação

O modelo de cruzamentos mistos de Ritland & Jain (1981) tem como um dos pressupostos a segregação independente dos alelos de diferentes locos, ou seja, a ausência de ligação entre os locos utilizados em análises do sistema reprodutivo. Assim, para avaliar a associação entre locos, utilizou-se o teste de desequilíbrio gamético baseado na medida composta de Burrows. Das 153 combinações possíveis para os pares de locos das progênes da população BM, somente quinze apresentaram desequilíbrio de ligação (Tabela 12), envolvendo os locos  $\beta$ -EST-2, GOT-1, GDH-2, GTDH-1, GLDH-1 e MDH-2. Nas progênes da população PB, os onze locos avaliados resultaram em 55 combinações de pares de locos. Dessas, em apenas onze combinações foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação entre os pares, envolvendo três locos:  $\alpha$ -EST-2,  $\beta$ -EST-1 e  $\beta$ -EST-2 (Tabela 12). Esses resultados indicam que os alelos dos pares de locos em desequilíbrio ligação estão associados e não segregam de maneira independente, de modo que, um dos locos deve ser removido de análises que requeiram locos em equilíbrio gamético. Como nos demais pares de locos não foram detectados indícios de ligação gamética, os doze locos restantes das progênes BM e os oito das progênes PB podem ser utilizados em estudos do sistema de reprodução, estrutura e diversidade genética de populações de *E. erythropappus*.



TABELA 12. Valores da medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ), com respectivos testes de qui-quadrado ( $X^2$ ) e probabilidades associadas ( $P$ ), para pares de locos isoenzimáticos que apresentaram desvios significativos da hipótese de desequilíbrio de ligação em populações de *Eremanthus erythropappus*.

| População BM<br>Locos            | $\hat{\Delta}_{ij}$ | $X^2$ | $P$    |
|----------------------------------|---------------------|-------|--------|
| $\beta$ -EST-2 : SDH-1           | 0.063               | 5.00  | 0.0253 |
| $\beta$ -EST-2 : SDH-2           | -0.060              | 7,5   | 0.0062 |
| GOT-1 : GDH2                     | -0.071              | 5,10  | 0,0239 |
| GOT-1 : SDH2                     | 0,125               | 10,00 | 0,0016 |
| GOT-1 : GTDH1                    | -0,035              | 7,50  | 0,0062 |
| GOT-1 : GLDH1                    | 0,125               | 10,00 | 0,0016 |
| GDH2 : GDH1                      | -0,024              | 5,14  | 0,0233 |
| GDH2 : GLDH1                     | -0,054              | 6,14  | 0,0132 |
| GDH2 : $\beta$ -EST-1            | -0,040              | 3,99  | 0,0457 |
| GTDH2 : GLDH1                    | 0,070               | 4,04  | 0,0443 |
| GTDH2 : MDH1                     | 0,020               | 4,38  | 0,0365 |
| GTDH2 : ADH2                     | 0,031               | 5,00  | 0,0253 |
| GLDH1 : SDH1                     | 0,037               | 12,86 | 0,0003 |
| GLDH1 : MDH2                     | 0,065               | 4,31  | 0,0380 |
| MDH2 : ADH1                      | 0,063               | 3,97  | 0,0463 |
| População PB<br>Locos            | $\hat{\Delta}_{ij}$ | $X^2$ | $P$    |
| $\beta$ -EST-1 : $\beta$ -EST-2  | 0.060               | 8.92  | 0.0028 |
| $\beta$ -EST-1 : ACP-1           | 0.025               | 5.14  | 0.0233 |
| $\beta$ -EST-1 : $\alpha$ -EST-1 | -0.022              | 9.84  | 0.0017 |
| $\beta$ -EST-1 : GOT-1           | 0.056               | 15.00 | 0.0001 |
| $\beta$ -EST-2 : $\alpha$ -EST-2 | 0.040               | 11.67 | 0.0006 |
| $\beta$ -EST-2 : SDH1            | -0.035              | 11.03 | 0.0009 |
| $\beta$ -EST-2 : ACP-1           | -0.047              | 4.29  | 0.0384 |
| $\beta$ -EST-2 : MDH1            | 0.094               | 5.40  | 0.0201 |
| $\beta$ -EST-2 : ADH1            | -0.049              | 12.67 | 0.0004 |
| $\alpha$ -EST-2 : SDH1           | 0.030               | 6.06  | 0.0138 |
| $\alpha$ -EST-2 : GTDH1          | 0.020               | 4.37  | 0.0365 |



## 4.4 Sistema reprodutivo

### 4.4.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Equilíbrio de Endogamia de Wright

O sistema reprodutivo de *E. erythropappus* foi inicialmente abordado pela avaliação da existência de EHW nas suas populações. Esta abordagem só é possível quando se analisa mais de uma geração, como o caso das populações BM e PB e, dessa maneira, nas populações BR, CR e MP verificou-se apenas o ajuste das proporções genóticas ao EHW. Assim, as cinco populações de *E. erythropappus* e as progênes das populações BM e PB foram submetidas ao teste exato de Fisher, para verificar se as proporções genóticas se ajustam ao modelo de EHW. Este teste se mostra mais adequado quando há frequências esperadas reduzidas (inferior a 5). O modelo de equilíbrio tem como pressupostos cruzamentos aleatórios, ausência de mutação, migração, seleção, deriva genética e tamanho infinito das populações (Futuyma, 1992; Mettler & Gregg, 1973). Em EHW a frequência relativa dos alelos deve permanecer a mesma de uma geração para outra, sendo a única mudança possível na composição genética da população a redistribuição dos alelos dentro dos genótipos da nova geração (Futuyma, 1992). As porcentagens de locos em EHW foram de 66,7% para a população BM, 57,1% para a BR, 52,4% para a população CR, 76,2% para a MP e 61,9% para a população PB (Tabela 13). O teste exato de Fischer detectou desvios significativos do modelo de equilíbrio em 50% dos locos das progênes da população BM e em 72,7% dos locos das progênes de PB. Apenas os locos ACP-1 e GLDH-3 apresentaram-se em EHW para todas as populações, exceto nas progênes, enquanto que os locos SDH-2,

GDH-2 e GTDH-2 mostraram-se em EHW tanto para as populações, como para as progênies.

Os desvios do EHW podem ser causados pelo sistema de reprodução ou por fatores evolutivos como seleção, migração, mutação ou deriva genética. Por meio do teste de Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW) é possível conhecer se os desvios do EHW foram causados pelo sistema de reprodução ou por fatores evolutivos (Sebbenn, 2001). No entanto, este teste só pôde ser aplicado aos locos  $\alpha$ -EST-1 e  $\beta$ -EST-1 por possuírem três alelos, devido à necessidade de um grau de liberdade para a estimativa do coeficiente de endogamia. A Tabela 13 mostra que, na população BM, os dois locos,  $\alpha$ -EST-1 e  $\beta$ -EST-1, assim como o loco  $\beta$ -EST-1 da população PB, apresentaram desvios do modelo de EEW, indicando a atuação de forças evolutivas, possivelmente, seleção a favor de heterozigotos. Os resultados indicam que apenas o loco  $\alpha$ -EST-1 da população PB pode estar fora da condição de EHW devido ao sistema reprodutivo da espécie.

TABELA 13. Probabilidade do teste exato de Fisher para a hipótese de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cinco populações naturais e duas progênies de *Eremianthus erythropappus* e teste de qui-quadrado para o teste de Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW) nas progênies.

| Adultos |                      | Progênies            |                      |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Loco    | BM                   | BR                   | CR                   |
|         | BM                   | MP                   | MP                   |
|         | EHW (P)              | EHW (P)              | EHW (P)              |
|         | EBW(X <sup>2</sup> ) | EBW(X <sup>2</sup> ) | EBW(X <sup>2</sup> ) |
|         | PB                   | PB                   | PB                   |
| ACP-1   | 0,695 ns             | 0,058 ns             | 0,248 ns             |
| ADH-1   | 0,719 ns             | 0,471 ns             | 0,703 ns             |
| ADH-2   | 1,000 ns             | 0,487 ns             | 0,479 ns             |
| α-EST-1 | 0,005**              | 0,028*               | 0,028*               |
| α-EST-2 | 0,031*               | 0,119 ns             | 0,675 ns             |
| β-EST-1 | 0,008**              | 0,000**              | 0,003**              |
| β-EST-2 | 0,000**              | 0,000**              | 0,179 ns             |
| GDH-1   | 0,009**              | 0,025*               | 0,029*               |
| GDH-2   | 0,717 ns             | 0,697 ns             | 0,219 ns             |
| GLDH-1  | 0,008**              | 0,021*               | 0,067 ns             |
| GLDH-2  | 0,151 ns             | 0,240 ns             | 0,724 ns             |
| GLDH-3  | 0,443 ns             | 0,288 ns             | 1,000 ns             |
| GOT-1   | 0,651 ns             | 0,076 ns             | 1,000 ns             |
| GTDH-1  | 0,000**              | 0,001**              | 0,465 ns             |
| GTDH-2  | 0,146 ns             | 0,127 ns             | 1,000 ns             |
| GTDH-3  | 0,648 ns             | 0,042*               | 0,002**              |
| MDH-1   | 0,379 ns             | 0,123 ns             | 1,000 ns             |
| MDH-2   | 0,088 ns             | 0,724 ns             | 0,495 ns             |
| SDH-1   | 0,153 ns             | 0,000**              | 0,005**              |
| SDH-2   | 1,000 ns             | 0,444 ns             | 0,212 ns             |
| SDH-3   | 0,189 ns             | 0,021*               | 0,017*               |
| ACP-1   | 0,000**              | 0,000**              | 0,18 ns              |
| ADH-1   | 0,000**              | 0,000**              | 0,014*               |
| ADH-2   | 0,000**              | 0,000**              | 0,002**              |
| α-EST-1 | 0,000**              | 0,000**              | 0,000**              |
| α-EST-2 | 0,000**              | 0,000**              | 0,106 ns             |
| β-EST-1 | 0,000**              | 0,000**              | 0,001**              |
| β-EST-2 | 0,000**              | 0,000**              | 0,253 ns             |
| GDH-1   | 0,009**              | 0,025*               | 0,000**              |
| GDH-2   | 0,662 ns             | 0,000**              | 1,000 ns             |
| GLDH-1  | 0,891 ns             | 0,004**              | 0,004**              |
| GLDH-2  | 0,190 ns             | 0,039*               | 0,050*               |
| GLDH-3  | -                    | -                    | 0,071 ns             |
| GOT-1   | 0,047*               | 0,066 ns             | 1,000 ns             |
| GTDH-1  | 0,009**              | 0,009**              | 0,129 ns             |
| GTDH-2  | 0,873 ns             | 0,713 ns             | 0,130 ns             |
| GTDH-3  | 0,608 ns             | 0,037*               | 0,037*               |
| MDH-1   | 0,370 ns             | 0,063 ns             | 1,000 ns             |
| MDH-2   | 0,530 ns             | 1,000 ns             | 0,655 ns             |
| SDH-1   | 0,003**              | 1,000 ns             | 0,136 ns             |
| SDH-2   | 0,438 ns             | 0,444 ns             | 0,444 ns             |
| SDH-3   | -                    | 0,253 ns             | 0,008**              |
| ACP-1   | 0,000**              | 0,000**              | 0,18 ns              |
| ADH-1   | 0,000**              | 0,000**              | 0,014*               |
| ADH-2   | 0,000**              | 0,000**              | 0,002**              |
| α-EST-1 | 0,000**              | 0,000**              | 0,000**              |
| α-EST-2 | 0,000**              | 0,000**              | 0,106 ns             |
| β-EST-1 | 0,000**              | 0,000**              | 0,001**              |
| β-EST-2 | 0,000**              | 0,000**              | 0,253 ns             |
| GDH-1   | 0,009**              | 0,025*               | 0,000**              |
| GDH-2   | 0,662 ns             | 0,000**              | 1,000 ns             |
| GLDH-1  | 0,891 ns             | 0,004**              | 0,004**              |
| GLDH-2  | 0,190 ns             | 0,039*               | 0,050*               |
| GLDH-3  | -                    | -                    | 0,071 ns             |
| GOT-1   | 0,047*               | 0,066 ns             | 1,000 ns             |
| GTDH-1  | 0,009**              | 0,009**              | 0,129 ns             |
| GTDH-2  | 0,873 ns             | 0,713 ns             | 0,130 ns             |
| GTDH-3  | 0,608 ns             | 0,037*               | 0,037*               |
| MDH-1   | 0,370 ns             | 0,063 ns             | 1,000 ns             |
| MDH-2   | 0,530 ns             | 1,000 ns             | 0,655 ns             |
| SDH-1   | 0,003**              | 1,000 ns             | 0,136 ns             |
| SDH-2   | 0,438 ns             | 0,444 ns             | 0,444 ns             |
| SDH-3   | -                    | 0,253 ns             | 0,008**              |

ns - não significativo; \*

#### 4.4.2 Homogeneidade das frequências de pólen e óvulos

O teste de homogeneidade das frequências alélicas de pólen e óvulos mostrou diferenças significativas em doze dos dezoito locos (66,7%) avaliados na população BM. Na população PB, sete dos onze locos (63,6%) apresentaram divergência genética significativa entre as frequências de pólen e óvulos (Tabela 14). Esses resultados evidenciam que a distribuição do pólen não foi homogênea para todas as árvores maternas, indicando que os cruzamentos não foram aleatórios. Essa heterogeneidade nas frequências de pólen e óvulos vai contra um dos pressupostos do modelo de cruzamentos mistos de Ritland & Jain (1981). No entanto, tais desvios podem propiciar o entendimento de outros fatores no processo de reprodução (Gusson, 2003). A contribuição desigual de pólen e óvulos entre árvores adultas dentro de uma população pode ter origem na variação espacial e temporal entre árvores, na fenologia e fecundidade (Mitton, 1992) e na proporção de árvores adultas que se reproduzem (Murawski & Hamrick, 1991). A presença de pólen proveniente de outras populações, a seleção entre o tempo de polinização e análise das progênies, a ocorrência de cruzamentos não aleatórios e a amostragem não representativa das árvores maternas também são fatores que levam à heterogeneidade nas frequências alélicas dos conjuntos gênicos materno e paterno (Lee et al., 2000; Ritland & Jain, 1981).

A comparação entre as frequências alélicas das árvores adultas vs. pólen e adultos vs. óvulos revelaram divergências genéticas baixas (máxima de 0,062) na população BM, com exceção do loco ACP-1 ( $\hat{F}_{ST}=0,164$ ), porém significativas em grande parte dos locos. Na população PB, as mesmas comparações revelaram resultados semelhantes à população BM, com divergências genéticas baixas (máxima de 0,042), excetuando-se o loco GOT-1

( $\hat{F}_{ST}$  iguais 0,166 e 0,128), mas significativas (Tabela 15). Esses resultados indicam que as vinte árvores amostradas em cada população não representaram as árvores adultas, em termos de frequências alélicas. A heterogeneidade nas frequências alélicas dos adultos vs. pólen (Tabela 15) sugere, ainda, que o pólen também não foi uma amostra representativa das populações. Este resultado pode ter sido causado por cruzamentos entre parentes, cruzamentos biparentais e/ou imigração de pólen de outras populações. Dessa forma, pode-se considerar que as causas mais prováveis para a heterogeneidade detectada nas populações de *E. erythropappus* foram o fluxo de genes externo, a amostragem não representativa das árvores maternas e a ocorrência de cruzamentos não aleatórios nas populações. Embora tenham sido detectadas violações nas pressuposições do modelo misto de Ritland & Jain (1981), estes desvios têm pouco efeito sobre a estimativa das taxas de cruzamento multilocos, principalmente quando tais estimativas estão baseadas num grande número de locos, acima de quatro ou cinco (Ritland & Jain, 1981).

Divergências genéticas ( $\hat{F}_{ST}$ ) nas frequências alélicas dos adultos vs. progênies foram verificadas em alguns locos, nas populações BM e PB. Na população BM um terço dos locos (33%) apresentaram desvios significativos, enquanto na população PB esses desvios ocorreram em três dos onze (27%) locos avaliados (Tabela 15). Considerando a natureza supostamente neutra dos marcadores isoenzimáticos e a baixa taxa de substituição de códons detectáveis por isoenzimas ( $10^{-7}$ , de acordo com Nei, 1975), excluindo assim fatores evolutivos, como a seleção e a mutação, os desvios podem ser atribuídos à deriva genética e/ou o sistema de reprodução. O sistema reprodutivo, contudo, não altera as frequências alélicas, apenas as genotípicas. Portanto, embora a maior parte dos locos nas duas populações não tenha revelado heterogeneidade

nas frequências alélicas dos adultos e das progênies, os desvios encontrados podem ser atribuídos à deriva genética.

TABELA 14. Divergência genética ( $\hat{F}_{ST}$ ) entre as frequências alélicas de pólen e óvulos das progênes de *Eremanthus erythropappus*.  $X^2$ : teste qui-quadrado; GL: graus de liberdade.

| Loco            | Alelo | População BM |        |                |          |         |    | População PB |        |                |          |         |    |
|-----------------|-------|--------------|--------|----------------|----------|---------|----|--------------|--------|----------------|----------|---------|----|
|                 |       | Pólen        | Óvulos | $\hat{F}_{ST}$ | <i>n</i> | $X^2$   | GL | Pólen        | Óvulos | $\hat{F}_{ST}$ | <i>n</i> | $X^2$   | GL |
| ACP             | 1     | 0,221        | 0,725  |                |          |         |    | 0,323        | 0,650  |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,779        | 0,275  | 0,255          | 191      | 97,32** | 1  | 0,677        | 0,350  | 0,107          | 196      | 41,95** | 1  |
| ADH-1           | 1     | 0,648        | 0,275  |                |          |         |    | 0,439        | 0,500  |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,352        | 0,725  | 0,140          | 173      | 48,43** | 1  | 0,561        | 0,500  | 0,004          | 188      | 1,40    | 1  |
| ADH-2           | 1     | 0,451        | 0,750  |                |          |         |    |              |        |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,549        | 0,250  | 0,093          | 181      | 33,73** | 1  |              |        |                |          |         |    |
| $\alpha$ -EST-1 | 1     | 0,205        | 0,025  |                |          |         |    | 0,006        | 0,033  |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,388        | 0,450  |                |          |         |    | 0,420        | 0,400  |                |          |         |    |
|                 | 3     | 0,407        | 0,525  | 0,021          | 178      | 7,52*   | 2  | 0,575        | 0,567  | 0,001          | 189      | 0,22    | 2  |
| $\alpha$ -EST-2 | 1     | 0,596        | 0,475  |                |          |         |    | 0,434        | 0,750  |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,404        | 0,525  | 0,015          | 185      | 5,44*   | 1  | 0,566        | 0,250  | 0,103          | 160      | 33,07** | 1  |
| $\beta$ -EST-1  | 1     | 0,132        | 0,024  |                |          |         |    | 0,023        | 0,025  |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,399        | 0,366  |                |          |         |    | 0,335        | 0,350  |                |          |         |    |
|                 | 3     | 0,469        | 0,610  | 0,015          | 167      | 4,90    | 2  | 0,642        | 0,625  | 0,001          | 180      | 0,09    | 2  |
| $\beta$ -EST-2  | 1     | 0,513        | 0,425  |                |          |         |    | 0,452        | 0,650  |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,487        | 0,575  | 0,008          | 169      | 2,63    | 1  | 0,548        | 0,350  | 0,039          | 141      | 11,17** | 1  |
| GDH-1           | 1     | 0,676        | 0,375  |                |          |         |    | 0,513        | 0,400  |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,324        | 0,625  | 0,091          | 190      | 34,52** | 1  | 0,497        | 0,600  | 0,012          | 181      | 4,31*   | 1  |
| GDH-2           | 1     | 0,505        | 0,700  |                |          |         |    |              |        |                |          |         |    |
|                 | 2     | 0,495        | 0,300  | 0,040          | 194      | 15,40** | 1  |              |        |                |          |         |    |



“Tabela 14. Cont.”

|        |   |       |       |       |     |         |   |       |       |       |     |          |   |
|--------|---|-------|-------|-------|-----|---------|---|-------|-------|-------|-----|----------|---|
| GLDH-1 | 1 | 0,576 | 0,450 |       |     |         |   |       |       |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,424 | 0,550 | 0,016 | 193 | 6,13*   | 1 |       |       |       |     |          |   |
| GLDH-2 | 1 | 0,512 | 0,600 |       |     |         |   |       |       |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,488 | 0,400 | 0,008 | 194 | 3,04    | 1 |       |       |       |     |          |   |
| GOT    | 1 | 0,549 | 0,550 |       |     |         |   | 0,310 | 0,975 |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,451 | 0,450 | 0,000 | 172 | 0,00    | 1 | 0,690 | 0,025 | 0,481 | 195 | 187,71** | 1 |
| GTDH-1 | 1 | 0,615 | 0,350 |       |     |         |   | 0,452 | 0,450 |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,385 | 0,650 | 0,070 | 182 | 25,59** | 1 | 0,548 | 0,550 | 0,000 | 165 | 0,00     | 1 |
| GTDH-2 | 1 | 0,633 | 0,575 |       |     |         |   |       |       |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,367 | 0,425 | 0,004 | 190 | 1,34    | 1 |       |       |       |     |          |   |
| MDH-1  | 1 | 0,522 | 0,350 |       |     |         |   | 0,407 | 0,525 |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,478 | 0,650 | 0,030 | 181 | 10,89** | 1 | 0,593 | 0,475 | 0,014 | 186 | 5,20*    | 1 |
| MDH-2  | 1 | 0,675 | 0,525 |       |     |         |   |       |       |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,325 | 0,475 | 0,023 | 180 | 8,44**  | 1 |       |       |       |     |          |   |
| SDH-1  | 1 | 0,632 | 0,325 |       |     |         |   | 0,372 | 0,625 |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,368 | 0,675 | 0,094 | 190 | 35,88** | 1 | 0,628 | 0,375 | 0,064 | 184 | 23,56**  | 1 |
| SDH-2  | 1 | 0,596 | 0,625 |       |     |         |   |       |       |       |     |          |   |
|        | 2 | 0,404 | 0,375 | 0,001 | 189 | 0,33    | 1 |       |       |       |     |          |   |

n: tamanho amostral.

(\*):  $P \leq 0,05$ . (\*\*):  $P \leq 0,01$ .

Tabela 15. Divergência genética ( $\hat{F}_{ST}$ ) entre as frequências alélicas dos adultos vs. progênies, adultos vs. pólen e adultos vs. óvulos em duas populações naturais de *Eremanthus erythropappus*.

| Loco            | $\hat{F}_{ST}$       |                  |                   |                      |                  |                   |
|-----------------|----------------------|------------------|-------------------|----------------------|------------------|-------------------|
|                 | População BM         |                  |                   | População PB         |                  |                   |
|                 | Adultos vs progênies | Adultos vs pólen | Adultos vs óvulos | Adultos vs progênies | Adultos vs pólen | Adultos vs óvulos |
| ACP             | 0,012*               | 0,164**          | 0,012*            | 0,002                | 0,022**          | 0,034**           |
| ADH-1           | 0,001                | 0,062**          | 0,017*            | 0,017*               | 0,000            | 0,004             |
| ADH-2           | 0,000                | 0,017*           | 0,031**           |                      |                  |                   |
| $\alpha$ -EST-1 | 0,016                | 0,025*           | 0,025*            | 0,003                | 0,004            | 0,002             |
| $\alpha$ -EST-2 | 0,004                | 0,013*           | 0,000             | 0,002                | 0,042**          | 0,015*            |
| $\beta$ -EST-1  | 0,043**              | 0,033**          | 0,045**           | 0,001                | 0,001            | 0,001             |
| $\beta$ -EST-2  | 0,019*               | 0,019*           | 0,050**           | 0,034**              | 0,008            | 0,080**           |
| GDH-1           | 0,006                | 0,059**          | 0,004             | 0,000                | 0,003            | 0,002             |
| GDH-2           | 0,001                | 0,004            | 0,019**           |                      |                  |                   |
| GLDH-1          | 0,003                | 0,001            | 0,010*            |                      |                  |                   |
| GLDH-2          | 0,000                | 0,005            | 0,000             |                      |                  |                   |
| GOT             | 0,037**              | 0,037**          | 0,038**           | 0,005                | 0,166**          | 0,128**           |
| GTDH-1          | 0,000                | 0,018**          | 0,018**           | 0,000                | 0,000            | 0,000             |
| GTDH-2          | 0,005                | 0,010            | 0,002             |                      |                  |                   |
| MDH-1           | 0,019**              | 0,059**          | 0,005             | 0,028**              | 0,002            | 0,014*            |
| MDH-2           | 0,003                | 0,001            | 0,014*            |                      |                  |                   |
| SDH-1           | 0,002                | 0,018**          | 0,032**           | 0,000                | 0,021**          | 0,012*            |
| SDH-2           | 0,021**              | 0,017*           | 0,025**           |                      |                  |                   |

\*:  $P \leq 0,05$ . \*\*:  $P \leq 0,01$ .

#### 4.4.3 Taxas de cruzamento multilocos e unilocos

O sistema reprodutivo da maioria das espécies arbóreas tropicais é acessado por estimativas das taxas de cruzamento. O modelo de cruzamentos mistos de Ritland & Jain (1981) tem sido bastante utilizado para estimar estas taxas de cruzamento em diversas espécies arbóreas como *Cedrela fissilis* (Gandara, 1996; Póvoa, 2002), *Cariniana legalis* (Sebbenn et al., 2000a), *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 2001) dentre outras. Esse modelo considera que as progênies avaliadas resultam de uma mistura de cruzamentos

aleatórios e autofecundação e, como considera as combinações genotípicas envolvendo todos os locos, as estimativas de cruzamento são consideradas mais adequadas do que outros modelos.

As estimativas da taxa de cruzamento multilocos ( $\hat{t}_m$ ) indicam a proporção de cruzamentos pelas quais as progênies foram originadas. Estas estimativas foram de 0,982 na população BM e 0,999 na população PB (Tabela 16), indicando que a espécie *E. erythropappus* é alógama, reproduzindo-se predominantemente por cruzamentos, visto que tais estimativas não foram significativamente diferentes de 1,0. Grande parte das espécies arbóreas tropicais tem apresentado valores elevados nas estimativas da taxa de cruzamento como 0,917 em *Copaifera langsdorffii* (Oliveira et al., 2002), 0,816 em *Chorisia speciosa* (Souza et al., 2002) e 0,990 em *Cedrela fissilis* (Póvoa, 2002). Os valores das taxas de cruzamento multilocos obtidos para *E. erythropappus* são semelhantes aos encontrados para outras espécies arbóreas classificadas como pioneiras e que apresentam alta densidade populacional, como *Trema micrantha*, com  $\hat{t}_m$  variando de 0,819 a 0,966 e *Cecropia pachystachya*, com  $\hat{t}_m$  igual a 1 (Kageyama et al., 2003b). Seoane et al. (2001) também obtiveram taxas de cruzamento elevadas (maiores que 0,925) para *Esenbeckia leiocarpa*, uma espécie que apresenta densidade populacional elevada e Gusson (2003) estimou taxas maiores que 0,985 para *Eschweilera ovata*, que ocorre em alta densidade e considerada uma espécie pioneira antrópica.

Tabela 16. Estimativa dos parâmetros do sistema de reprodução de *Eremanthus erythropappus* em duas populações naturais.

| Parâmetros  | Populações                 |                            |
|---|----------------------------|----------------------------|
|   | BM                         | PB                         |
| Taxa de cruzamento multilocos ( $\hat{i}_m$ )                       | 0,982 (0,018)              | 0,999 (0,006)              |
| Taxa de cruzamento unilocos ( $\hat{i}_s$ )                         | 0,965 (0,005)              | 0,978 (0,002)              |
| Taxa de cruzamento entre aparentados ( $\hat{i}_m - \hat{i}_s$ )    | 0,017 (0,018)              | 0,021 (0,002)              |
| Correlação de autofecundação ( $\hat{f}_s$ )                        | 0,081 (0,016)              | 0,107 (0,000)              |
| Correlação de paternidade ( $\hat{f}_p$ )                           | 0,718 (0,074)              | 0,651(0,089)               |
| N <sup>o</sup> médio de árvores doadoras de pólen ( $1/\hat{f}_p$ ) | 1,4                        | 1,5                        |
| Proporção de irmãos de autofecundação ( $\hat{P}_{IA}$ )            | 1,8%                       | 0,01%                      |
| Proporção de irmãos completos ( $\hat{P}_{IC}$ )                    | 70,5%                      | 65,1%                      |
| Proporção de meios-irmãos ( $\hat{P}_{MI}$ )                        | 27,7%                      | 34,9%                      |
| Índice de fixação nas árvores maternas ( $\hat{F}_m$ )              | 0,000                      | 0,000                      |
| Índice de fixação nas árvores adultas ( $\hat{F}_a$ )               | -0,065<br>[-0,224 a 0,093] | -0,125<br>[-0,294 a 0,049] |
| Índice de fixação nas progênes ( $\hat{F}_p$ )                      | -0,085<br>[-0,187 a 0,019] | -0,136<br>[-0,259 a 0,007] |
| Coancestria dentro de progênes ( $\hat{\theta}_{xy}$ )              | 0,206                      | 0,181                      |
| Tamanho efetivo de variância ( $\hat{N}_{e(v)}$ )                   | 2,41                       | 2,74                       |
| Tamanho efetivo de variância total ( $\hat{N}_{e(v)t}$ )            | 48,2                       | 54,8                       |
| Número de matrizes para reter $\hat{N}_e = 150$ ( $\hat{m}$ )       | 63                         | 55                         |
| Número total de árvores matrizes ( $m$ )                            | 20                         | 20                         |
| Número total de progênes ( $n$ )                                    | 184                        | 179                        |

[ ] Intervalo de confiança a 95% de probabilidade, obtido por 10.000 reamostragens (*bootstrap*) sobre locos.

( ) Erro padrão da média, obtido por 1.000 reamostragens (*bootstrap*).

As taxas de cruzamento uniloco estimadas foram menores que as taxas de cruzamento multilocos, com valores de 0,965 na população BM e 0,978 na população PB. Esta comparação entre as estimativas multilocos e unilocos

$(\hat{t}_m - \hat{t}_s)$  permite avaliar a ocorrência de cruzamentos entre aparentados, possibilitando a caracterização da ocorrência de endogamia por essa via (Ritland & Jain, 1981; Ritland & El Kassaby, 1985). As taxas de cruzamentos entre aparentados  $(\hat{t}_m - \hat{t}_s)$  foram de 0,017 (população BM) e 0,021 (população PB), não sendo diferentes entre as duas populações (Tabela 16). Esses resultados mostram valores inferiores aos encontrados para outras espécies arbóreas de alta densidade populacional como *Eschweilera ovata* (Gusson, 2003) com taxas de 0,066 e 0,073, antes e após manejo, respectivamente. Kageyama et al. (2003b), comparando espécies de diferentes estágios sucessionais, concluíram que as espécies pioneiras tendem a apresentar maiores taxas de cruzamento entre parentes, associadas à distribuição agregada, ao grande tamanho populacional e ao ciclo de vida mais curto. Esses mesmos autores encontraram taxas de cruzamento entre parentes de 0,071 e 0,123 para populações naturais de *Trema micrantha* e de 0,180 e 0,199 para populações de *Cecropia pachystachya*, bem mais elevadas do que as obtidas neste trabalho. Apesar dos baixos valores estimados para as taxas de cruzamento entre parentes nas populações naturais de *E. erythropappus*, a estimativa obtida para a população PB apresentou significância a 95% de probabilidade, evidenciando um certo nível de cruzamentos entre parentes dentro desta população. Essa presença de parentesco pode ser resultado da ocorrência de sobreposição de gerações que, por sua vez, pode ser intensificada pela rapidez de colonização, crescimento e extinção, características de espécies pioneiras. Segundo Allard (1971) o cruzamento entre aparentados pode gerar endogamia biparental dentro das populações, apesar desse tipo de endogamia ser menos drástico do que a autofecundação efetiva. Os cruzamentos entre aparentados aumentam a quantidade de homocigotos na população, possibilitando a depressão por endogamia pela expressão de genes deletérios recessivos (Ellstrand & Elam, 1993). Em um

programa de melhoramento genético para *E. erythropappus* o conhecimento do grau de parentesco é de grande importância, pois ele deve ser considerado nas estimativas dos parâmetros genéticos, evitando-se, assim, a obtenção de estimativas errôneas da variância genética aditiva e parâmetros afins (Squillace, 1974; Surlles et al., 1990).

As estimativas das taxas de cruzamentos individuais variaram de 0,87 a 1,00 nas árvores maternas da população BM e de 0,43 a 1,00 nas árvores maternas da população PB (Tabela 17). Seis das vinte progênies da população BM apresentaram taxas de cruzamento inferiores a 1,0, mas apenas nas progênies 08 e 18 essa diferença foi significativa. Analisando as progênies da população PB, verificou-se que, em sete das doze progênies que apresentaram taxas de cruzamento inferiores a 1,0, essa diferença foi significativa. Dessa maneira, como 10% das progênies da população BM e 35% das progênies da população PB apresentaram valores das taxas de cruzamento significativamente diferentes da unidade, a espécie *E. erythropappus* pode ser considerada uma espécie de reprodução mista, predominantemente alógama. As taxas de autofecundação estimadas para a população BM (Tabela 17) podem ser consideradas baixas (máximo de 0,13). Na população PB, apesar das taxas de autofecundação também serem consideradas baixas, um maior número de progênies apresentou estimativas mais elevadas de  $\hat{s}$  (Tabela 17). Esta variação entre as taxas de cruzamentos individuais pode estar associada a um possível assincronismo nas florações masculina e feminina ou, ainda, ao comportamento dos polinizadores. É possível que as progênies 10 e 18, da população BM, e 04, 05, 08, 09 e 16, da população PB, tenham florescido no início ou no pico da floração masculina, na qual havia menor quantidade de pólen disponível para os cruzamentos, favorecendo, assim, a autofecundação.



Tabela 17. Estimativas das taxas de cruzamentos individuais por progênies ( $\hat{t}$ ) e taxas de autofecundação ( $\hat{s}$ ) em duas populações naturais de *Eremanthus erythropappus*.

| População BM |             |           | População PB |             |           |
|--------------|-------------|-----------|--------------|-------------|-----------|
| Progênies    | $\hat{t}$   | $\hat{s}$ | Progênies    | $\hat{t}$   | $\hat{s}$ |
| 01           | 0,90 (0,10) | 0,10      | 01           | 1,00 (0,00) | 0,00      |
| 02           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 02           | 1,00 (0,00) | 0,00      |
| 03           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 03           | 0,90 (0,09) | 0,10      |
| 04           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 04           | 0,76 (0,16) | 0,24      |
| 05           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 05           | 0,63 (0,17) | 0,37      |
| 06           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 06           | 1,00 (0,00) | 0,00      |
| 07           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 07           | 0,88 (0,18) | 0,12      |
| 08           | 0,91 (0,08) | 0,09      | 08           | 0,43 (0,20) | 0,57      |
| 09           | 0,90 (0,10) | 0,10      | 09           | 0,81 (0,13) | 0,19      |
| 10           | 0,87 (0,15) | 0,13      | 10           | 1,00 (0,00) | 0,00      |
| 11           | 0,91 (0,09) | 0,09      | 11           | 0,90 (0,09) | 0,10      |
| 12           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 12           | 1,00 (0,00) | 0,00      |
| 13           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 13           | 0,93 (0,08) | 0,07      |
| 14           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 14           | 1,00 (0,00) | 0,00      |
| 15           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 15           | 0,91 (0,09) | 0,09      |
| 16           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 16           | 0,76 (0,18) | 0,24      |
| 17           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 17           | 0,97 (0,07) | 0,03      |
| 18           | 0,89 (0,10) | 0,11      | 18           | 1,00 (0,00) | 0,00      |
| 19           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 19           | 0,92 (0,09) | 0,08      |
| 20           | 1,00 (0,00) | 0,00      | 20           | 1,00 (0,00) | 0,00      |

( ) Erro padrão da média, obtido por 1.000 reamostragens (*bootstrap*).

#### 4.4.4 Taxas de cruzamentos correlacionados

A correlação de autofecundação ( $\hat{r}_s$ ) corresponde à probabilidade de encontrar um indivíduo gerado por autofecundação em uma progênie onde exista outro também gerado por autofecundação. As estimativas de  $\hat{r}_s$  foram de 0,081 e 0,107, para as populações BM e PB, respectivamente. Estes valores são diferentes entre si (Tabela 16) e podem ser considerados baixos, porém



significativos, indicando a presença de indivíduos advindos de autofecundação nas progênes das duas populações de *E. erythropappus*. As estimativas de  $\hat{r}_s$  revelaram que os indivíduos oriundos de autofecundação encontram-se aleatoriamente distribuídos entre as progênes e sugerem que não há a tendência de algumas plantas maternas gerarem mais indivíduos por autofecundação do que outras, evidenciando ainda que a taxa de cruzamento não variou muito entre as árvores (Tabela 17).

O sistema misto de reprodução é conceituado como a mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundações. No entanto, esta conceituação desconsidera a ocorrência de cruzamentos biparentais, uma outra forma de reprodução que também pode causar desvios de cruzamentos aleatórios, mesmo em espécies obrigatoriamente de cruzamentos, como as espécies dióicas (Souza et al., 2003). A correlação de paternidade ( $r_p$ ) de Ritland (1989) mede a proporção de indivíduos de cruzamentos que foram gerados por cruzamentos biparentais, ou seja, irmãos completos. As estimativas da correlação de paternidade em *E. erythropappus* foram elevadas, de 0,718 para as progênes da população BM e de 0,651 para as progênes da população PB, revelando que, grande parte das progênes de cruzamentos, foram geradas por cruzamentos biparentais (Tabela 16). Valores elevados de correlação de paternidade foram descritos por Kageyama et al. (2003b) para *Esenbeckia leiocarpa* ( $\hat{r}_p$  acima de 0,749) e para *Trema micrantha* ( $\hat{r}_p$  de 0,606 e 0,602) e por Gusson (2003) para *Eschweilera ovata* ( $\hat{r}_p$  variou de 0,423 a 0,577), sendo todas as espécies de alta densidade populacional. A taxa de cruzamentos multilocos ( $\hat{r}_m$ ), combinada com a correlação de paternidade ( $\hat{r}_p$ ), permite inferir que 1,8 % das progênes da população BM foram originadas por autofecundação, sendo sua relação de parentesco de irmãos de autofecundação, 70,5% por cruzamentos biparentais,

sendo aparentadas no grau de irmãos completos e 27,7 % por cruzamentos aleatórios, sendo aparentadas no grau de meio-irmãos. A relação  $1/\hat{r}_p$  indicou que, em média, apenas dois indivíduos contribuíram com pólen no evento de reprodução de uma árvore-mãe (Tabela 16). Na população PB, 0,1% das progênies analisadas originaram por autofecundação, 65,0% por cruzamentos biparentais e 34,9% por cruzamentos aleatórios. Cerca de dois indivíduos, em média, doaram pólen para a reprodução de cada árvore materna na população PB. O número de polinizadores efetivos foram baixos, mas semelhantes aos números de polinizadores encontrados em *Teobroma grandiflorum* (Alves et al., 2003 e em *Myracrodruon urundeuva* (Moraes et al., 2003). Os elevados valores estimados para as correlações de paternidade indicaram que as progênies de *E. erythropappus* avaliadas são, na maioria, irmãos completos, contrastando com a teoria geral de que há o predomínio de cruzamentos aleatórios nas populações naturais. De acordo com Sun & Ritland (1998), os cruzamentos biparentais podem ser causados pelo assincronismo no florescimento das árvores, pelo comportamento dos polinizadores, visitando de forma sistemática árvores próximas, por poliandria e por pequenos tamanhos de vizinhança. Variações no comportamento do polinizador, densidade de plantas e número de flores por plantas podem alterar os parâmetros do sistema de cruzamento (Franceschinelli & Bawa, 2000). É provável que alguns desses fatores tenham contribuído para as altas taxas de cruzamentos biparentais observadas em *E. erythropappus*. Como não há informações referentes à polinização, sobre quem é o polinizador e qual o seu comportamento forrageiro, tornam-se necessários estudos sobre a biologia reprodutiva desta espécie para uma melhor compreensão dos cruzamentos biparentais detectados.

#### 4.4.5 Coeficiente de coancestria e tamanho efetivo de variância

O coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) é de fundamental importância em programas de melhoramento genético, para a estimativa do coeficiente de correlação de parentesco ( $r_{xy}$ ) entre plantas dentro de progênes, pois este coeficiente de correlação é a base de cálculo da variância genética aditiva, coeficientes de herdabilidade e ganhos genéticos na seleção. Em espécies de cruzamentos, como no caso de *E. erythropappus*, o coeficiente de correlação de parentesco é o dobro do coeficiente de coancestria ( $r_{xy} = 2\theta_{xy}$ ), de maneira que alterações na coancestria geram alterações no coeficiente de correlação de parentesco. No presente trabalho, os valores estimados para o coeficiente de coancestria foram de 0,206 para as progênes da população BM e 0,181 para as da população PB (Tabela 16). Estas estimativas são 39,3% e 30,9 % superiores ao esperado em progênes de meio-irmãos (0,125) para as progênes das populações BM e PB, respectivamente. As estimativas de coancestria acima do esperado para meio-irmãos podem ser atribuídas aos elevados valores obtidos para as correlações de paternidade ( $\hat{r}_p$ ), pois a maior parte das progênes geradas nas duas populações é aparentada no grau de irmãos completos. Os modelos clássicos de genética quantitativa, utilizados em programas de melhoramento genético, pressupõem que as progênes de polinização aberta são compostas exclusivamente por meio-irmãos, no caso de espécies alógamas. No entanto, não sendo esta pressuposição verdadeira, os parâmetros genéticos podem ser superestimados. Dessa forma, em programas de melhoramento genético para *E. erythropappus*, devem ser utilizados modelos que considerem o sistema misto de reprodução, como os de Weir & Cockerham (1984) e de Ritland (1989).

O conhecimento do coeficiente de coancestria ( $\theta_{xy}$ ) permite estimar o tamanho efetivo de variância ( $N_{e(v)}$ ), que é uma medida, em termos de deriva genética, da representatividade genética de uma amostra de progênie retirada de uma população ideal. A estimativa do  $N_{e(v)}$  é afetada pelo sistema misto de reprodução, devido à endogamia causada por autofecundações e cruzamentos entre aparentados, além da representatividade genética diminuir por causa da menor diversidade de indivíduos doadores de pólen (Gusson, 2003). Para as populações BM e PB, os valores estimados de  $\hat{N}_{e(v)}$  foram de 2,41 e de 2,74, respectivamente. Considerando que para espécies alógamas com população idealizada (tamanho infinito, cruzamentos aleatórios e ausência de seleção, migração e mutação) o valor teórico máximo esperado do tamanho efetivo de uma simples progênie é em torno de 4 (Gusson, 2003; Sebbenn, 1997), os valores estimados são 39,7% e 31,5 % menores do esperado, para as populações BM e PB, respectivamente. O número de matrizes necessárias para reter um tamanho efetivo de 150 para *E. erythropappus* foi de 63 matrizes para a população BM e de 55 matrizes para a população PB (Tabela 16). No entanto, para a manutenção da variação genética em longo prazo, considerando um tamanho efetivo de 1.500 e tomando-se como base as populações BM e PB, seriam necessárias 630 e 550 matrizes, respectivamente, para representar a espécie em *E. erythropappus*.

#### 4.5 Distribuição espacial dos genótipos

A distribuição espacial dos genótipos de *E. erythropappus*, dentro de cada população, foi obtida por meio de estimativas do coeficiente de coancestria entre plantas, para cada uma das dez classes de distância estabelecidas. Dentre as cinco populações estudadas, em duas populações, BR e CR, a avaliação da

distribuição espacial das árvores sugere uma possível ocorrência de estruturação espacial (Figuras 4 e 5). Na população BR os coeficientes de coancestria, obtidos nas segunda e terceira classes de distância (de 196 a 441 metros de distância) foram estimados em 0,028 e 0,021, respectivamente. Após 10.000 permutações, verificou-se que estas estimativas de coancestria foram positivas e significativas a 95 % de probabilidade ( $P= 0,012$  e  $P= 0,025$ , respectivamente). Na população CR o coeficiente de coancestria estimado foi igual a 0,032, sendo tal valor positivo e significativo a 95% de probabilidade ( $P= 0,006$ ), indicando a presença de parentesco na primeira classe de distância (até 87 metros). O parentesco estimado entre os indivíduos da população CR pode ser considerado próximo ao parentesco esperado entre indivíduos primos de segundo grau (0,031). Gusson et al. (2005) consideram que estimativas acuradas de coancestria e parentesco são difíceis de serem obtidas, quando não há informações sobre o pedigree do material, requerendo um grande número de locos polimórficos, com um número relativamente alto de alelos. No entanto, a despeito do número de alelos/loco ser menor quando comparados com marcadores microssatélites, por exemplo, a análise da distribuição dos genótipos nas cinco populações de *E. erythropappus*, aqui avaliadas, foi realizada a partir de dados provenientes de 21 locos isoenzimáticos polimórficos. Este número de locos é bem superior ao número utilizado por outros autores, para estudos de estrutura genética espacial, empregando-se a técnica de isoenzimas (Gusson et al., 2005; Loiselle et al., 1995).

Nas populações BM, MP e PB os valores estimados para os coeficientes de coancestria foram bem próximos a zero ou negativos, não significativos a 95% de probabilidade (Figuras 6, 7, e 8). Estes resultados sugerem a ocorrência de distribuição aleatória dos genótipos nessas três populações, indicando que árvores localizadas espacialmente próximas não apresentam nenhum grau de parentesco entre si. Não se deve desconsiderar, entretanto, que as populações

BM e PB apresentaram taxas de cruzamento entre aparentados diferentes de zero (0,017 e 0,021 para BM e PB, respectivamente), como foi visto no item 4.6.5. Estas taxas indicaram que existem indivíduos próximos, relacionados geneticamente, responsáveis por alguns cruzamentos endogâmicos. No entanto, os coeficientes de coancestria, estimados a partir de 21 locos de cada uma das populações, BM e PB, não foram significativos, indicando que o parentesco entre os indivíduos de cada população não foram suficientes para a formação de uma estruturação familiar.

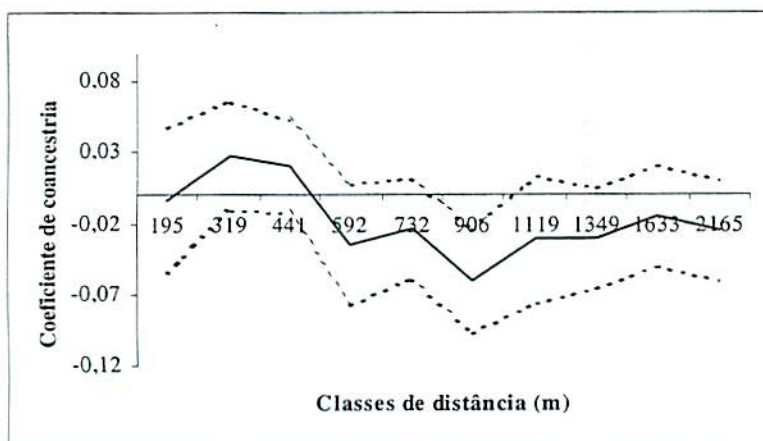


FIGURA 4. Correlograma para coeficiente de coancestria estimado por classes de distâncias na população BR de *Eremanthus erythropappus*. (— coeficiente de coancestria; --- intervalo de confiança a 95% de probabilidade).



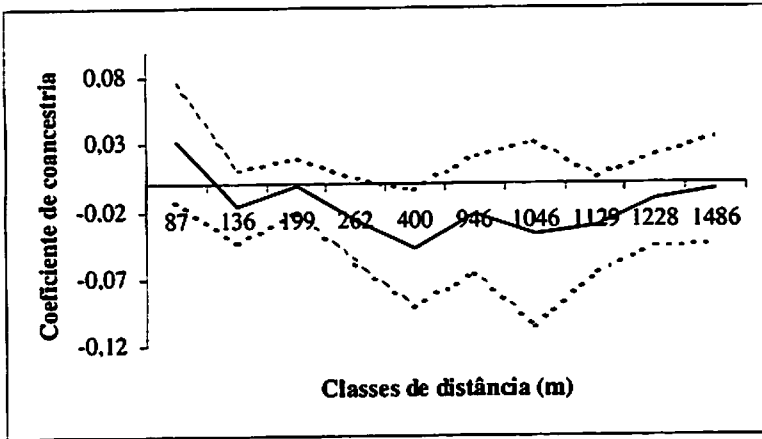


FIGURA 5. Correlograma para coeficiente de coancestria estimado por classes de distâncias na população CR de *Eremanthus erythropappus*. (— coeficiente de coancestria; --- intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

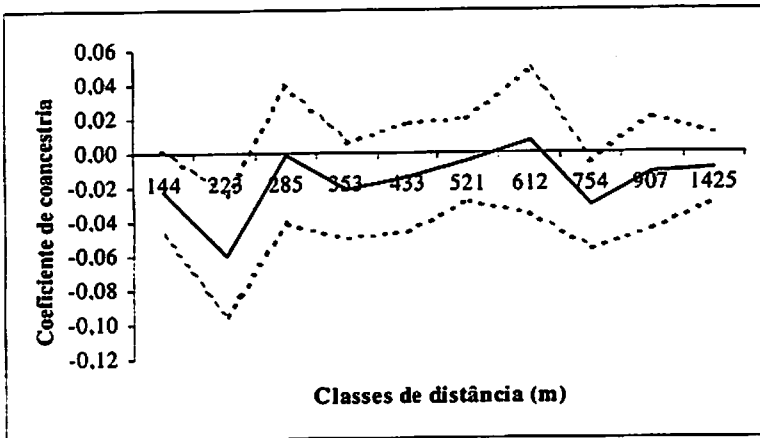


FIGURA 6. Correlograma para coeficiente de coancestria estimado por classes de distâncias na população BM de *Eremanthus erythropappus*. (— coeficiente de coancestria; --- intervalo de confiança a 95% de probabilidade).



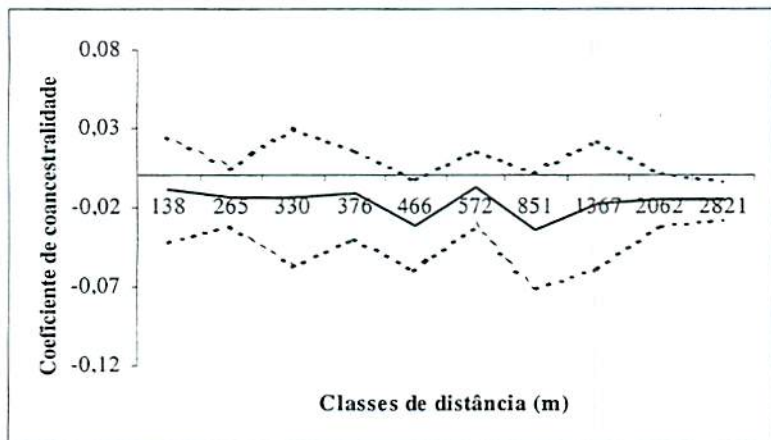


FIGURA 7. Correlograma para coeficiente de coancestria estimado por classes de distâncias na população MP de *Eremanthus erythropappus*. (— coeficiente de coancestria; --- intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

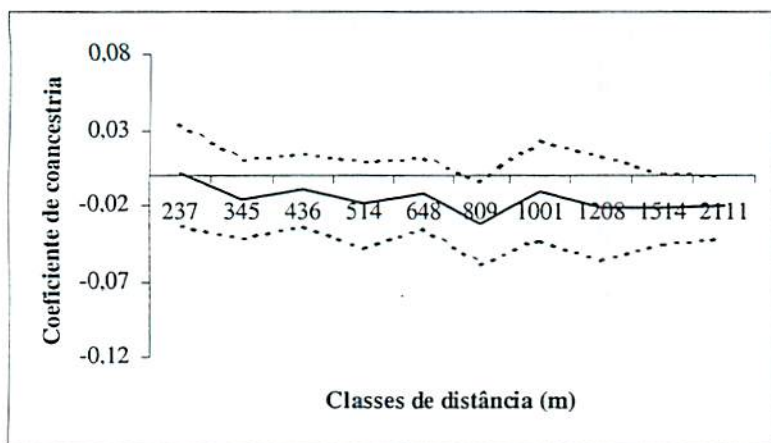


FIGURA 8. Correlograma para coeficiente de coancestria estimado por classes de distâncias na população PB de *Eremanthus erythropappus*. (— coeficiente de coancestria; --- intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

A presença de estruturação espacial dos genótipos, sugerida pelo coeficiente de coancestralidade para as populações BR e CR, foi confirmada pela estimativa do índice I de Moran (Figura 9 e 10). No caso da população BR, o padrão espacial foi evidenciado pelos valores positivos e significativos do índice I de Moran, a 95% de probabilidade, nas segunda e terceira classes de distância, ou seja, até cerca de 450 metros de distância. Na classe de distância de 750 a 900 metros, o índice I de Moran apresentou-se negativo e significativo a 95% de probabilidade. A população CR apresentou valores positivos e significativos do índice I de Moran nas segunda e quarta classes de distância, sugerindo estruturação espacial dos indivíduos até 200 metros de distância. Entre 350 e 400 metros o índice I de Moran apresentou valor negativo e significativo. No entanto, apesar de apresentar valores do índice I de Moran negativos e significativos em classes de distâncias maiores, em nenhuma das populações, BR e CR, foi observada uma tendência que permitisse sugerir que indivíduos mais distantes espacialmente sejam mais divergentes geneticamente. Nas populações BM, MP e PB não foram detectados indícios de estruturação genética espacial a partir do índice I de Moran (Figuras 11, 12 e 13), como já havia sido sugerido pelos resultados obtidos pelos coeficientes de coancestralidade. A análise dos valores médios do índice I de Moran, nestas três populações, mostrou que os índices mantêm-se praticamente constantes, demonstrando, assim, a não-formação de estrutura espacial significativa.

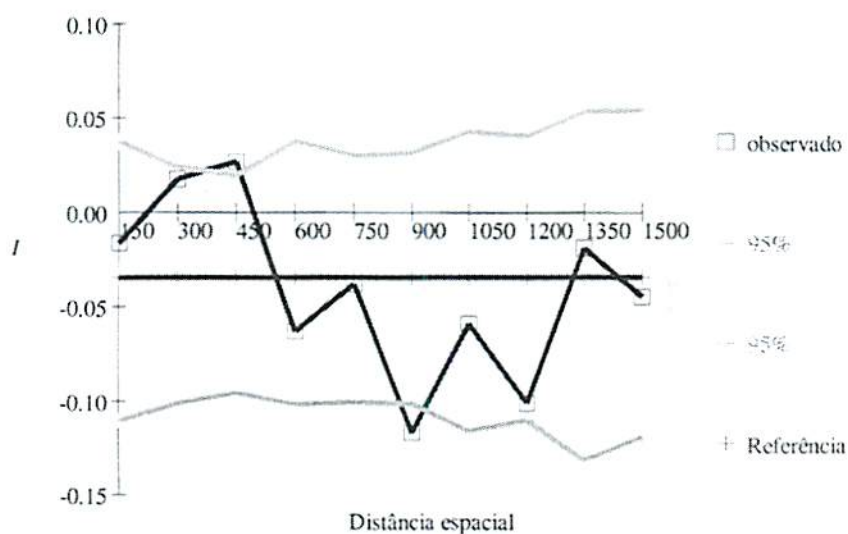


FIGURA 9. Correlograma do índice I de Moran para dez classes de distâncias na população BR de *Eremanthus erythropappus*.

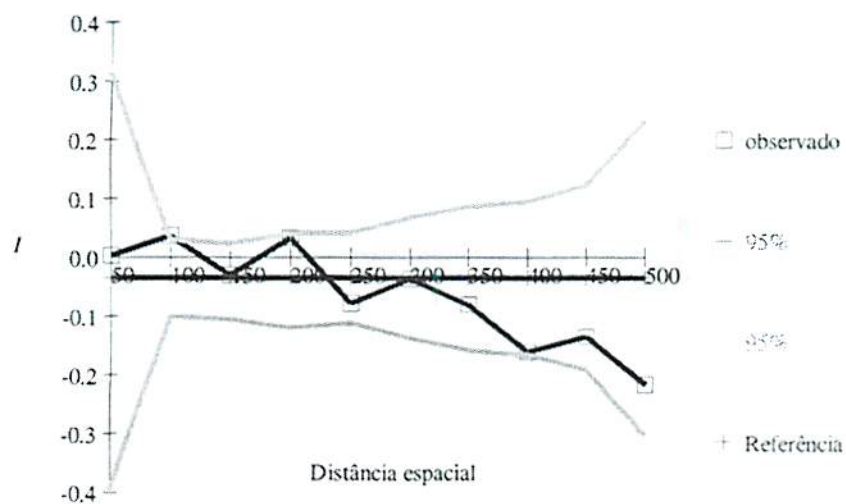


FIGURA 10. Correlograma do índice I de Moran para dez classes de distâncias na população CR de *Eremanthus erythropappus*.

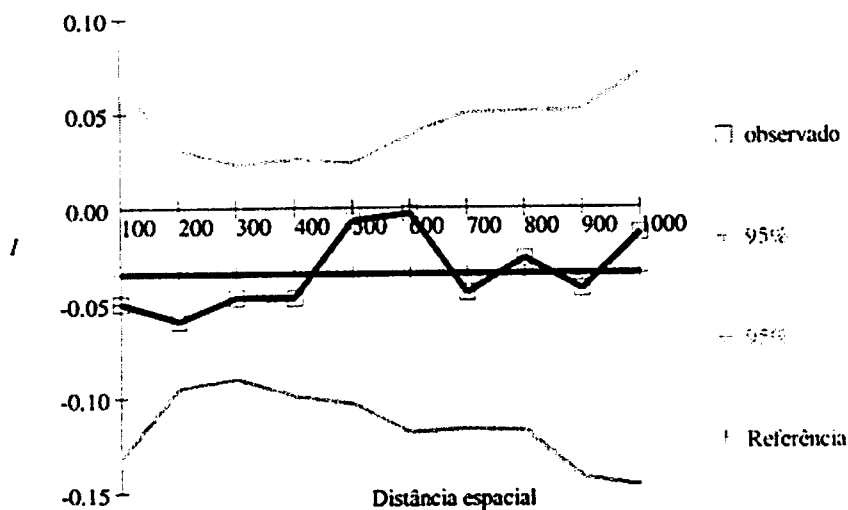


FIGURA 11. Correlograma do índice I de Moran para dez classes de distâncias na população BM de *Eremanthus erythropappus*.

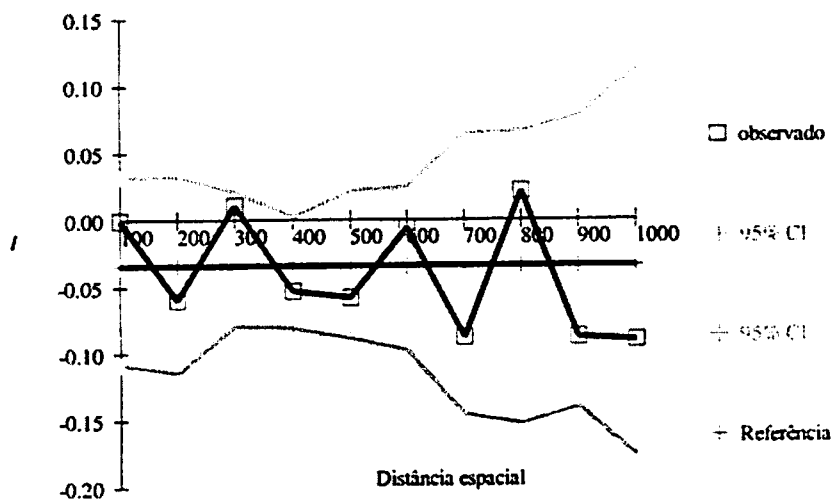


FIGURA 12. Correlograma do índice I de Moran para dez classes de distâncias na população MP de *Eremanthus erythropappus*.

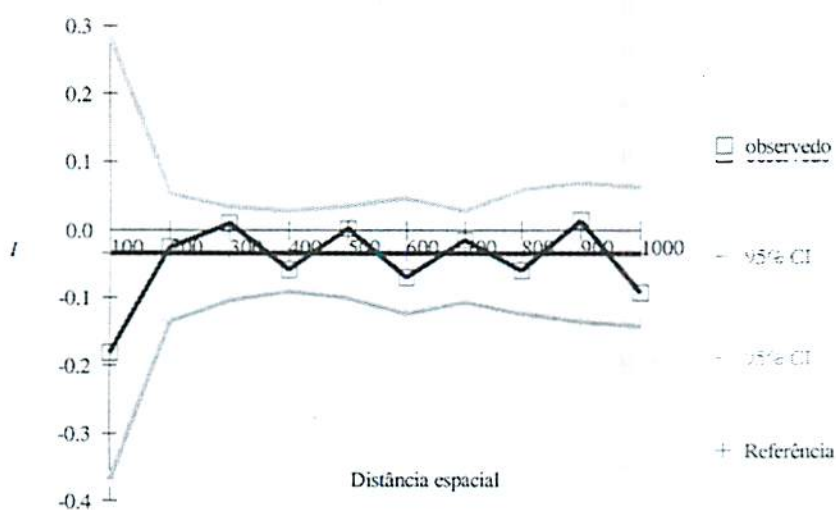


FIGURA 13. Correlograma do índice I de Moran para dez classes de distâncias na população PB de *Eremanthus erythropappus*.

A presença de estruturação espacial dos indivíduos em populações naturais de espécies arbóreas já foi verificada em diversos estudos (Gusson et al., 2005; Moraes et al., 2004; Silva et al., 2004). Considerando a hipótese de que a similaridade de condições ecológicas como clima, solo e altitude pode levar a similaridade genética entre indivíduos (Graudal et al., 1997), e que a dispersão do pólen e sementes dentro das populações muitas vezes podem ser limitadas às vizinhanças da matriz, supõe-se que árvores mais próximas apresentem maior similaridade genética do que árvores mais distantes espacialmente (Graudal et al., 1997; Sokal & Menozzi, 1982). Futuyma (1992) considera que, em uma população, existem limitações físicas que podem dificultar os cruzamentos aleatórios, devendo haver maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos mais próximos, o que, por sua vez, pode levar à formação de grupos, estruturando a população.

verificam-se poucas diferenças entre elas, o que sugere a existência de um equilíbrio entre as gerações. Além disso, observa-se que, para a maioria dos locos analisados, o alelo mais comum nos adultos também foi o mais comum nas progênes, indicando uma coerência nas frequências alélicas.

TABELA 18. Frequências alélicas e tamanho da amostra (n) em adultos e progênes de *E. erythropappus*.

| Loco    | Alelo | Adultos |       |       |         | Progênes |       |       |
|---------|-------|---------|-------|-------|---------|----------|-------|-------|
|         |       | BM      | BR    | CR    | MP      | PB       | BM    | PB    |
| ACP-1   | 1     | 0,621   | 0,517 | 0,483 | 0,577   | 0,467    | 0,511 | 0,513 |
|         | 2     | 0,379   | 0,483 | 0,517 | 0,423   | 0,533    | 0,489 | 0,487 |
|         | N     | 29      | 30    | 30    | 26      | 30       | 169   | 196   |
| ADH-1   | 1     | 0,400   | 0,400 | 0,433 | 0,464   | 0,328    | 0,428 | 0,457 |
|         | 2     | 0,600   | 0,600 | 0,567 | 0,536   | 0,672    | 0,572 | 0,543 |
|         | n     | 30      | 30    | 30    | 29      | 29       | 173   | 188   |
| ADH-2   | 1     | 0,583   | 0,450 | 0,433 | 0,534   | 0,621    | 0,597 | -     |
|         | 2     | 0,417   | 0,550 | 0,567 | 0,466   | 0,379    | 0,403 | -     |
|         | n     | 30      | 30    | 30    | 29      | 29       | 181   | -     |
| α-EST-1 | 1     | 0,138   | 0,093 | 0,133 | 0,100   | 0,083    | 0,110 | 0,024 |
|         | 2     | 0,259   | 0,278 | 0,200 | 0,350   | 0,367    | 0,407 | 0,399 |
|         | 3     | 0,603   | 0,630 | 0,667 | 0,55019 | 0,550    | 0,483 | 0,577 |
|         | n     | 29      | 27    | 30    | 30      | 30       | 178   | 189   |
| α-EST-2 | 1     | 0,483   | 0,444 | 0,317 | 0,519   | 0,638    | 0,543 | 0,600 |
|         | 2     | 0,517   | 0,556 | 0,683 | 0,481   | 0,362    | 0,457 | 0,400 |
|         | n     | 30      | 27    | 30    | 26      | 29       | 185   | 160   |
| β-EST-1 | 1     | 0,267   | 0,155 | 0,190 | 0,083   | 0,050    | 0,066 | 0,019 |
|         | 2     | 0,167   | 0,621 | 0,448 | 0,417   | 0,317    | 0,386 | 0,317 |
|         | 3     | 0,567   | 0,224 | 0,362 | 0,500   | 0,633    | 0,548 | 0,664 |
|         | N     | 30      | 29    | 29    | 30      | 30       | 167   | 180   |
| β-EST-2 | 1     | 0,648   | 0,385 | 0,589 | 0,680   | 0,367    | 0,512 | 0,550 |
|         | 2     | 0,352   | 0,615 | 0,411 | 0,320   | 0,633    | 0,488 | 0,450 |
|         | n     | 29      | 30    | 30    | 26      | 30       | 169   | 141   |
| GDH-1   | 1     | 0,433   | 0,310 | 0,350 | 0,500   | 0,450    | 0,513 | 0,448 |
|         | 2     | 0,567   | 0,690 | 0,650 | 0,500   | 0,550    | 0,487 | 0,552 |
|         | n     | 30      | 29    | 30    | 29      | 30       | 190   | 181   |
| GDH-2   | 1     | 0,567   | 0,362 | 0,383 | 0,385   | 0,463    | 0,601 | -     |
|         | 2     | 0,433   | 0,638 | 0,617 | 0,615   | 0,537    | 0,399 | -     |
|         | n     | 30      | 29    | 30    | 26      | 27       | 194   | -     |
| GLDH-1  | 1     | 0,552   | 0,379 | 0,417 | 0,450   | 0,375    | 0,497 | -     |
|         | 2     | 0,448   | 0,621 | 0,583 | 0,550   | 0,625    | 0,503 | -     |
|         | n     | 29      | 29    | 30    | 30      | 28       | 193   | -     |

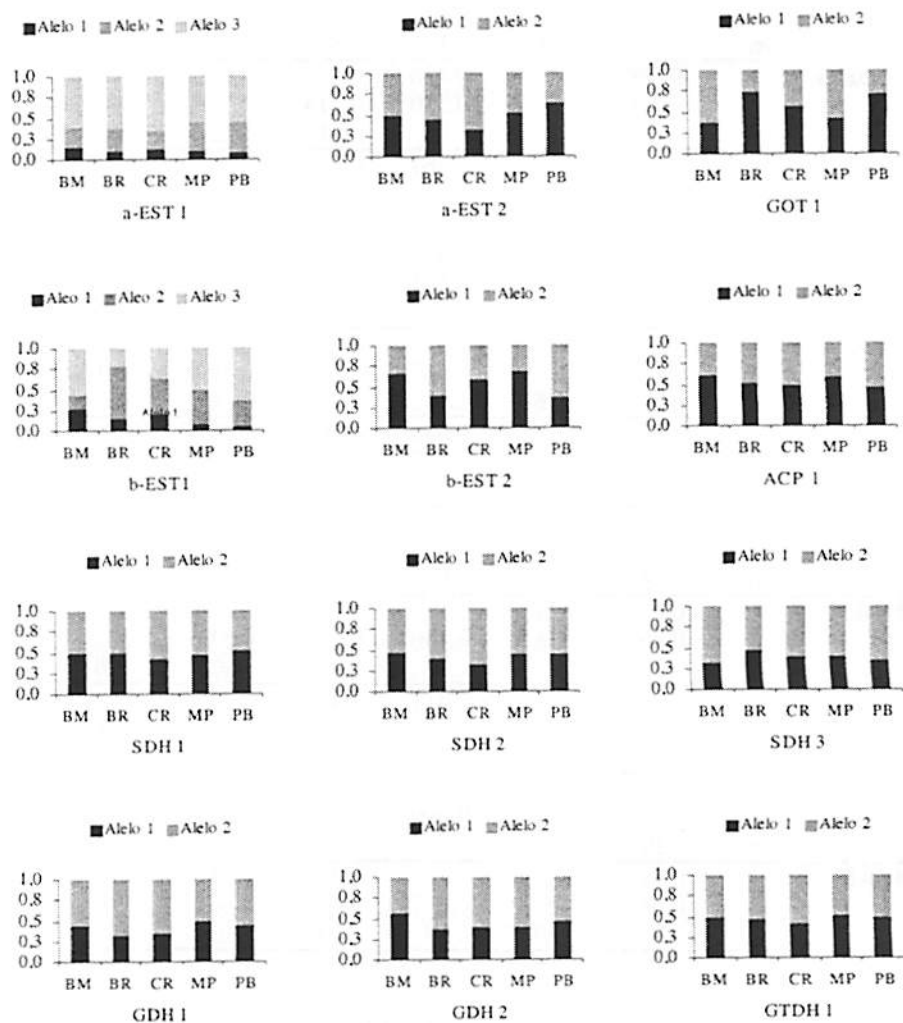
“...continua...”

“Tabela 18. Cont.”

|        |   |       |       |       |       |       |       |       |
|--------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GLDH-2 | 1 | 0,583 | 0,362 | 0,350 | 0,500 | 0,574 | 0,570 | -     |
|        | 2 | 0,417 | 0,638 | 0,650 | 0,500 | 0,426 | 0,430 | -     |
|        | n | 30    | 29    | 30    | 30    | 27    | 194   | -     |
| GLDH-3 | 1 | 0,600 | 0,241 | 0,450 | 0,286 | 0,636 | -     | -     |
|        | 2 | 0,400 | 0,759 | 0,550 | 0,714 | 0,364 | -     | -     |
|        | n | 30    | 27    | 30    | 14    | 22    | -     | -     |
| GOT-1  | 1 | 0,357 | 0,724 | 0,567 | 0,420 | 0,717 | 0,549 | 0,649 |
|        | 2 | 0,643 | 0,276 | 0,433 | 0,580 | 0,283 | 0,451 | 0,351 |
|        | n | 21    | 29    | 30    | 25    | 30    | 172   | 195   |
| GTDH-1 | 1 | 0,483 | 0,462 | 0,417 | 0,519 | 0,483 | 0,462 | 0,467 |
|        | 2 | 0,517 | 0,538 | 0,583 | 0,481 | 0,517 | 0,538 | 0,533 |
|        | n | 30    | 26    | 30    | 27    | 30    | 182   | 165   |
| GTDH-2 | 1 | 0,534 | 0,500 | 0,333 | 0,481 | 0,536 | 0,603 | -     |
|        | 2 | 0,466 | 0,500 | 0,667 | 0,519 | 0,464 | 0,397 | -     |
|        | n | 29    | 26    | 30    | 27    | 28    | 190   | -     |
| GTDH-3 | 1 | 0,293 | 0,365 | 0,650 | 0,700 | 0,776 | -     | -     |
|        | 2 | 0,707 | 0,635 | 0,350 | 0,300 | 0,224 | -     | -     |
|        | n | 29    | 26    | 30    | 30    | 29    | -     | -     |
| MDH-1  | 1 | 0,283 | 0,552 | 0,317 | 0,600 | 0,296 | 0,417 | 0,457 |
|        | 2 | 0,717 | 0,448 | 0,683 | 0,400 | 0,704 | 0,583 | 0,543 |
|        | n | 28    | 29    | 30    | 25    | 27    | 181   | 186   |
| MDH-2  | 1 | 0,643 | 0,397 | 0,550 | 0,646 | 0,483 | 0,592 | -     |
|        | 2 | 0,357 | 0,603 | 0,450 | 0,354 | 0,517 | 0,408 | -     |
|        | n | 28    | 29    | 30    | 24    | 30    | 180   | -     |
| SDH-1  | 1 | 0,500 | 0,481 | 0,411 | 0,467 | 0,517 | 0,455 | 0,508 |
|        | 2 | 0,500 | 0,519 | 0,589 | 0,533 | 0,483 | 0,545 | 0,492 |
|        | n | 30    | 26    | 28    | 30    | 30    | 190   | 184   |
| SDH-2  | 1 | 0,467 | 0,383 | 0,310 | 0,433 | 0,431 | 0,611 | -     |
|        | 2 | 0,533 | 0,617 | 0,690 | 0,567 | 0,569 | 0,389 | -     |
|        | n | 30    | 30    | 29    | 30    | 29    | 189   | -     |
| SDH-3  | 1 | 0,317 | 0,467 | 0,383 | 0,400 | 0,350 | -     | -     |
|        | 2 | 0,683 | 0,533 | 0,617 | 0,600 | 0,650 | -     | -     |
|        | n | 30    | 30    | 30    | 30    | 30    | -     | -     |

Observando a Tabela 18 e a Figura 14, nota-se que, para o conjunto das populações, não houve grandes mudanças nas frequências alélicas. Considerando como similares dois alelos que apresentem frequências entre 0,350 e 0,650, observa-se que 67% dos locos das populações BM e MP apresentam equidade gênica (ou baixa amplitude de variação), enquanto que nas populações BR, CR e PB esta proporção é de 71%.

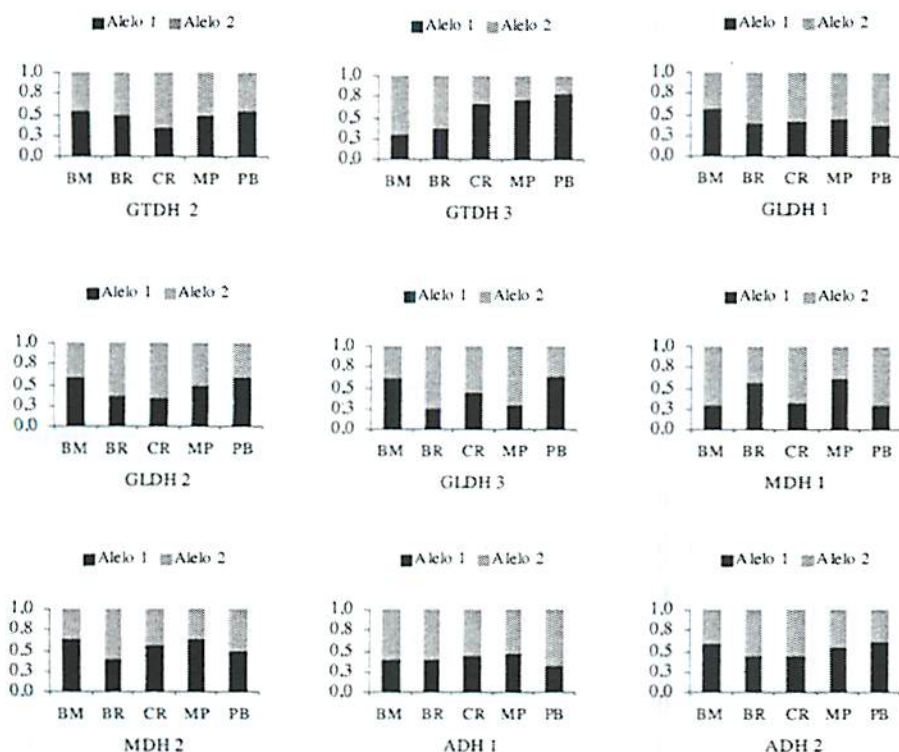




“... continua ...”

FIGURA 14. Demonstrativo gráfico das freqüências alélicas em 21 locos de cinco populações de *Eremanthus erythropappus* (eixo x: populações BM, BR, CR, MP e PB; eixo y: freqüências alélicas).

“Figura 4. Cont.”



Segundo Frankel et al. (1996), a equidade gênica é conceituada como aquela na qual a menor variabilidade das frequências alélicas numa espécie é indicativo de maior diversidade e pode manter as populações menos susceptíveis à fixação e perda de alelos quando submetidas a perturbações e gargalos genéticos. Assim, a população com maior diversidade estaria mais protegida dos efeitos da deriva do que as que têm alelos em baixa frequência, estando estes mais susceptíveis de serem perdidos. A semelhança nas frequências alélicas das diferentes populações, juntamente com as proporções similares de equidade gênica sugerem uma baixa divergência entre as populações em estudo.

#### 4.6.2 Índices de variabilidade genética

A Tabela 19 apresenta os índices de variabilidade genética obtidos para as cinco populações de adultos e duas de progênies de *Eremanthus erythropappus*. Estas estimativas refletem altos níveis de variabilidade genética para *E. erythropappus*, indicando que a espécie é potencial para programas de conservação genética, melhoramento genético e manejo. O número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) variou de 2,18 (0,405) a 2,10 (0,300), sendo estes valores semelhantes aos descritos por Kageyama et al. (2003b) para *Trema micrantha*, uma espécie pioneira que também ocorre em alta densidade, cujo número médio de alelos por loco foi de 2,10 a 2,20. Além de refletir a riqueza alélica, os valores obtidos indicam uma distribuição semelhante dos alelos nas populações tanto de adultos quanto de progênies. O número efetivo de alelos variou de 1,91 (população PB) a 2,00 (progênies BM) e, considerando o desvio padrão apresentado para cada estimativa, nenhuma população diferenciou-se das demais. Esses valores foram superiores aos obtidos para *Myracrodruon urundeuva* (1,30 a 1,60) por Lacerda et al. (1999) e para *Xylopia emarginata* (1,52 a 1,79) por Jaeger (2004). Segundo Murawski & Bawa (1994) essa estimativa reflete o número de alelos necessário dentro de um loco para manter o nível atual de heterozigosidade e Ellstrand & Ellan (1993) consideram que, a longo prazo, a redução da riqueza alélica deve limitar a habilidade das espécies responderem às mudanças devido à ação de forças seletivas. Assim, pode-se considerar que *E. erythropappus* possui alto potencial evolutivo.

Para a média das populações, a estimativa da porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}_{95\%}$ ) foi de 100%, o número médio de alelos ( $\hat{A}$ ) foi de 2,10, o número médio de alelos efetivos ( $\hat{A}_e$ ) foi de 2,00, a heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_e$ ) foi de 0,500 e a heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) foi de 0,531. A alta

variabilidade genética de *E. erythropappus* fica evidenciada quando comparam-se estes valores com os descritos por Hamrick & Godt (1990) para espécies tropicais ( $\hat{P}_{95\%} = 58,9\%$ ;  $\hat{A} = 2,29$ ;  $\hat{H}_e = 0,202$ ), espécies de sistema misto de reprodução e polinização animal ( $\hat{P}_{95\%} = 49,2\%$ ;  $\hat{A} = 1,89$ ;  $\hat{H}_e = 0,148$ ) e estágio de sucessão inicial ( $\hat{P}_{95\%} = 40,0\%$ ;  $\hat{A} = 1,68$ ;  $\hat{H}_e = 0,120$ ).

TABELA 19. Índices de diversidade genética de cinco populações naturais e duas progênes de *Eremanthus erythropappus*, em que:  $\hat{A}$  - número médio de alelos por loco;  $\hat{H}_o$  - estimativa da heterozigosidade observada;  $\hat{H}_e$  - estimativa da heterozigosidade esperada;  $\hat{f}$  - estimativa do índice de fixação de Wright.

|            |          | $\hat{A}$ | $\hat{A}_e$     | $P$   | $\hat{H}_o$       | $\hat{H}_e$      | $\hat{f}$                    |
|------------|----------|-----------|-----------------|-------|-------------------|------------------|------------------------------|
| BM         | Adultos  | 2,10      | 1,94<br>(0,693) | 100,0 | 0,523<br>(0,181)  | 0,492<br>(0,039) | - 0,0648<br>[-0,224 a 0,093] |
|            | Progênes | 2,11      | 2,00<br>(0,709) | 100,0 | 0,503<br>(0,027)  | 0,500<br>(0,099) | - 0,0849<br>[-0,187 a 0,019] |
| BR         |          | 2,10      | 1,92<br>(0,133) | 100,0 | 0,528<br>(0,207)  | 0,484<br>(0,039) | - 0,0917<br>[-0,272 a 0,099] |
| CR         |          | 2,10      | 1,94<br>(0,196) | 100,0 | 0,517<br>(0,189)  | 0,489<br>(0,041) | - 0,0568<br>[-0,230 a 0,125] |
| MP         |          | 2,10      | 1,96<br>(0,149) | 100,0 | 0,553<br>(0,125)  | 0,497<br>(0,038) | - 0,1149<br>[-0,187 a 0,019] |
| PB         | Adultos  | 2,10      | 1,91<br>(0,147) | 100,0 | 0,539<br>(0,188)  | 0,480<br>(0,043) | - 0,1252<br>[-0,295 a 0,049] |
|            | Progênes | 2,18      | 1,96<br>(0,063) | 100,0 | 0,523<br>(0,0171) | 0,490<br>(0,129) | - 0,1360<br>[-0,259 a 0,007] |
| Média Pop. |          | 2,10      | 2,00<br>(0,144) | 100,0 | 0,532<br>(0,135)  | 0,488<br>(0,029) | - 0,0905<br>[-0,216 a 0,043] |

( ) - desvio padrão; [ ] - intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

O valor de heterozigidade esperada obtido também foi superior ao observado por Hamrick (1983) em um estudo envolvendo 38 espécies com dispersão de sementes pelo vento ( $\hat{H}_e = 0,238$ ). Valores elevados de heterozigidade são comuns em espécies com alta densidade populacional, pois a maior densidade de indivíduos pode permitir maior número de recombinações, resultando em altos níveis de diversidade genética. Trabalhos como o de Hamrick & Murawski (1991) mostram que a heterozigidade esperada pode ser maior em espécies comuns. Kageyama et al. (2003) também descrevem valores elevados de heterozigidade esperada para *Trema micrantha* (0,392) e para *Cecropia pachystachya* (0,355), ambas espécies pioneiras e de alta densidade populacional.

A heterozigidade média esperada ( $\hat{H}_e$ ) nas populações de adultos de *Eremanthus erythropappus* variou de 0,472 a 0,488 e a observada ( $\hat{H}_o$ ), de 0,517 a 0,553. As populações BM e PB apresentaram valores de  $\hat{H}_e$  menores (0,483 e 0,472) que suas respectivas progênies (0,504 e 0,523). Giudice Neto (1999) considera que pode ser esperada uma maior heterozigidade nas progênies, já que estas normalmente apresentam alelos exclusivos. No entanto, no presente estudo, não ocorreram alelos exclusivos às progênies. O contrário ocorreu quando se observa a heterozigidade média observada ( $\hat{H}_o$ ), sendo esta menor nas progênies BM e PB (0,499 e 0,489, respectivamente) do que nos adultos das populações BM e PB (0,520 e 0,539, respectivamente). Pode-se dizer que existe uma tendência de a heterozigidade alcançar maiores valores em indivíduos adultos, sugerindo um mecanismo seletivo atuando em favor dos heterozigotos. Tal tendência foi observada em diversos trabalhos, com espécies como *Euterpe edulis* (Reis, 1996b), *Chorisia speciosa* (Souza, 1997) e *Copaifera langsdorffii* (Oliveira, 2000).

De qualquer forma, verifica-se que as heterozigosidades ( $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$ ) foram elevadas, ressaltando a alta diversidade genética para a *E. erythropappus*, sendo os valores obtidos ligeiramente superiores aos descritos para *Eschweilera ovata* por Gusson (2003), cuja  $\hat{H}_e$  variou de 0,354 a 0,431 e  $\hat{H}_o$  variou de 0,332 a 0,371, e um pouco inferiores aos valores obtidos por Melo Júnior (2003) para *Caryocar brasiliense*, com  $\hat{H}_e$  variando de 0,450 a 0,530 e  $\hat{H}_o$  variando de 0,583 a 0,817.

A relação entre os índices de heterozigosidade observada e esperada gerou valores dos índices de fixação negativos, tanto para os adultos quanto para as progênies, evidenciando um excesso de heterozigotos (Tabela 19). No entanto, os valores obtidos não se diferenciaram estatisticamente de zero, estando, portanto, em equilíbrio de Hardy-Weinberg e sugerindo ausência de endogamia nos adultos e progênies de *E. erythropappus*. Comparando os valores de  $\hat{f}$  entre os adultos da população BM (-0,0648) e suas progênies (-0,0069), observa-se um aumento no excesso de heterozigotos nos adultos em relação às suas progênies, concordando com o observado em *Cryptocaria moschata* (Moraes, 1997), *Chorisia speciosa* (Souza, 1997) e *Copaifera langsdorffii* (Oliveira, 2000).

#### 4.7 Estrutura genética

A distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações de *E. erythropappus* (Tabela 20) foi avaliada utilizando-se a metodologia de Weir & Cockerham (1984), por meio das estatísticas F. Estas estatísticas fornecem os índices de fixação de alelos ao nível de populações ( $\hat{f}$ ), total das populações ( $\hat{F}$ ) e o coeficiente de coancestria ( $\hat{\theta}_p$ ), que é a probabilidade de se amostrar,

ao acaso, dois alelos idênticos por descendência em dois indivíduos dentro das populações. As estatísticas F também se referem à aderência das populações ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores de F iguais a zero indicam genótipos em EHW, valores positivos indicam excesso de homozigotos e valores negativos indicam excesso de heterozigotos (Wright, 1965).

TABELA 20. Coeficientes de coancestralidade entre cinco populações de adultos de *Eremanthus erythropappus* ( $\hat{f}$  = índice de fixação médio dentro das populações,  $\hat{F}$  = índice de fixação para o total das populações e  $\hat{\theta}_p$  = coeficiente de coancestria ou divergência genética entre as populações).

| Loco            | $\hat{f}$          | $\hat{F}$          | $\hat{\theta}_p$  |
|-----------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| ACP-1           | -0,162             | -0,159             | 0,002             |
| ADH-1           | -0,108             | -0,113             | -0,005            |
| ADH-2           | -0,104             | -0,091             | 0,012             |
| $\alpha$ -EST-1 | 0,365              | 0,357              | -0,013            |
| $\alpha$ -EST-2 | 0,219              | 0,247              | 0,035             |
| $\beta$ -EST-1  | 0,534              | 0,569              | 0,074             |
| $\beta$ -EST-2  | 0,412              | 0,449              | 0,062             |
| GDH-1           | -0,542             | -0,516             | 0,017             |
| GDH-2           | -0,055             | -0,040             | 0,014             |
| GLDH-1          | -0,360             | -0,346             | 0,010             |
| GLDH-2          | -0,128             | -0,088             | 0,035             |
| GLDH-3          | 0,003              | 0,105              | 0,103             |
| GOT-1           | -0,326             | -0,201             | 0,094             |
| GTDH-1          | -0,495             | -0,499             | -0,003            |
| GTDH-2          | -0,229             | -0,210             | 0,015             |
| GTDH-3          | -0,075             | 0,102              | 0,164             |
| MDH-1           | -0,129             | -0,040             | 0,079             |
| MDH-2           | -0,048             | -0,018             | 0,028             |
| SDH-1           | -0,370             | -0,376             | -0,004            |
| SDH-2           | -0,089             | -0,089             | -0,000            |
| SDH-3           | -0,397             | -0,392             | 0,003             |
| Média           | -0,091             | -0,052             | 0,035             |
|                 | [ -0,216 a 0,043 ] | [ -0,181 a 0,082 ] | [ 0,017 a 0,055 ] |

[ ] - intervalo de confiança a 95% de probabilidade.



O índice de fixação médio ( $\hat{f}$ ) foi negativo nas populações (-0,0905), indicando ausência de endogamia dentro das populações. A ausência de endogamia também foi verificada para o conjunto das populações (-0,0522) e, embora estes valores não sejam diferentes de zero a 95% de probabilidade, eles evidenciaram um excesso de heterozigotos. O excesso de heterozigotos em populações naturais de espécies arbóreas tem sido descrito para outras espécies tropicais como *Caryocar brasiliense* (Melo Júnior et al., 2004), *Xylopia brasiliensis* (Pinto & Carvalho, 2004) e adultos de *Trema micrantha* (Ribas & Kageyama, 2004).

A divergência entre as cinco populações de *E. erythropappus* obtida pela estimativa do  $\hat{\theta}_p$  foi de 0,035 (Tabela 20), indicando que a maior parte (96,5%) da variabilidade genética encontra-se dentro das suas populações. Esse valor está coerente com os valores obtidos para outras espécies arbóreas pioneiras e abundantes, de 0,029 para *Cecropia obtusifolia* (Alvarez-Buylla & Garay, 2004), de 0,026 para *Cecropia pachystachya* (Kageyama et al., 2003b) e de 0,039 para *Trema micrantha* (Ribas & Kageyama, 2004). Segundo Loveless & Hamrick (1984), espécies tipicamente alógamas apresentam alta variação genética dentro de suas populações e baixa entre elas.

As estimativas de divergência genética entre cada par de populações estão apresentadas na Tabela 21. Os resultados obtidos mostraram baixos valores de divergência genética entre populações. No entanto, apesar dessas baixas estimativas de divergência, todas foram significativas de acordo com o intervalo de confiança. Como as populações BM e BR encontram-se mais próximas geograficamente, distanciadas cerca de 2,6 km, esperava-se que ocorresse uma menor divergência genética entre elas. No entanto, quando comparadas duas a duas, as populações BM e BR apresentaram a maior estimativa de divergência entre os pares de populações ( $\hat{\theta}_p$  igual a 0,0619). Esse

resultado pode ser explicado pela diferença de altitude entre essas duas populações. A população BM encontra-se numa altitude mais elevada, em torno de 1.700 m de altitude, enquanto a população BR encontra-se numa altitude inferior, em torno de 1.400 m. A presença desse gradiente altitudinal pode estar afetando o fluxo gênico e, dessa forma, contribuindo para uma maior divergência entre as populações BM e BR.

TABELA 21. Coeficientes de coancestralidade para cinco populações adultas de *Eremanthus erythropappus* comparadas duas a duas ( $\hat{F}$  = índice de fixação para o total das populações,  $\hat{\theta}_p$  = coeficiente de coancestria ou divergência genética entre as populações, BM = população de Baependi 1, BR = população de Baependi 2, CR = população de Carrancas, MP = população de Morro do Pilar e PB = população do Poço Bonito).

| Populações | $\hat{\theta}_p$           |
|------------|----------------------------|
| BM e BR    | 0,0619<br>[0,026 a 0,100]  |
| BM e CR    | 0,0351<br>[0,014 a 0,061]  |
| BM e MP    | 0,0302<br>[0,001 a 0,069]  |
| BM e PB    | 0,0427<br>[0,004 a 0,093]  |
| BR e CR    | 0,0194<br>[0,003 a 0,039]  |
| BR e MP    | 0,0329<br>[0,006 a 0,062]  |
| BR e PB    | 0,0516<br>[0,0142 a 0,095] |
| CR e MP    | 0,0153<br>[0,002 a 0,032]  |
| CR e PB    | 0,0312<br>[0,013 a 0,052]  |
| MP e PB    | 0,0342<br>[0,006 a 0,066]  |

[ ] - intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

## 4.8 Fluxo gênico

O fluxo gênico é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra (Slatkin, 1985). A partir das medidas de divergência genética entre as populações, pode-se inferir sobre o fluxo de genes entre estas. Em grande parte dos casos, as estimativas de fluxo gênico consideram o modelo de migração de ilhas, no qual pequenas populações trocam alelos aleatoriamente entre si, independente de sua posição geográfica. No entanto, Slatkin & Barton (1989) consideram que os modelos contínuos, como o isolamento por distância, são mais realistas para a maioria das espécies de plantas. Desta forma, o conceito de tamanho efetivo populacional ou tamanho de vizinhança,  $N_b$ , proposto por Wright (1943) torna-se mais adequado para estes casos.

No presente estudo, as estimativas de fluxo gênico foram realizadas a partir da relação entre a divergência genética entre as populações e a quantidade de migrantes,  $\hat{N}m$  (Tabela 22). Os valores de fluxo gênico estimados foram elevados, sendo os maiores entre as populações CR e MP (15,04) e entre BR e CR (11,81). O fluxo gênico estimado para o conjunto das populações foi de 6,78 migrantes por geração. De acordo com as estimativas obtidas, o fluxo gênico entre as populações de *E. erythropappus* é suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética, visto que, segundo Hartl & Clark (1997), quando o fluxo gênico entre populações excede 4 migrantes por geração, ocorre a homogeneização dos alelos entre estas, que funcionam como populações panmíticas.

TABELA 22. Fluxo gênico ( $\hat{N}_m$ ), tamanho de vizinhança ( $\hat{N}_b$ ) para o conjunto e para cada par de populações de *Eremanthus erythropappus*, obtidos a partir da divergência genética ( $\hat{\theta}_p$ ).

| Populações | $\hat{\theta}_p$ | $\hat{N}_m$ | $\hat{N}_b$ |
|------------|------------------|-------------|-------------|
| BM e BR    | 0,062            | 3,536       | 22          |
| BM e CR    | 0,035            | 6,422       | 40          |
| BM e MP    | 0,030            | 7,502       | 47          |
| BM e PB    | 0,043            | 5,237       | 33          |
| BR e CR    | 0,019            | 11,808      | 74          |
| BR e MP    | 0,033            | 6,867       | 43          |
| BR e PB    | 0,052            | 4,294       | 27          |
| CR e MP    | 0,015            | 15,035      | 94          |
| CR e PB    | 0,031            | 7,254       | 45          |
| MP e PB    | 0,034            | 6,597       | 41          |
| Conjunto   | 0,035            | 6,780       | 42          |

Não foi observada uma relação entre o fluxo de genes e a distância geográfica das cinco populações. Desta forma, as populações BM e BR, distantes menos de 3 km uma da outra, apresentaram o menor valor de fluxo gênico estimado (3,54). Um fator que poderia explicar tal resultado é a diferença de 300 m de altitude entre estas duas populações. Da mesma forma, não se esperava encontrar um fluxo gênico intenso entre as populações CR e MP, já que esta última localiza-se a uma maior distância geográfica, superior a 250 quilômetros. No entanto, devemos considerar que o  $\hat{N}_m$ , calculado a partir da divergência genética, reflete o fluxo de genes ocorrido durante um longo período; ele não indica necessariamente que está havendo troca gênica em determinado evento reprodutivo, mas estima os níveis de fluxo gênico que

devem ter ocorrido no passado para produzir os padrões observados de estrutura genética. Assim, a baixa divergência entre as populações de *E. erythropappus*, considerando especialmente a localizada em Morro do Pilar, não deve ter ocorrido pelo fluxo de genes atual. É pouco provável que ele seja intenso o suficiente para manter as populações similares geneticamente, devido às distâncias que as separam.

Estimativas de fluxo gênico encontradas na literatura, como para *Euterpe edulis* (Reis, 1996b), *Cariniana legalis* (Sebbenn, 2001) e *Caryocar brasiliense* (Melo Júnior, 2003), indicam que a movimentação dos alelos ocorrem a longas distâncias em espécies tropicais e, portanto, os processos microevolutivos envolvem várias populações ou grupos mais distanciados. Segundo Reis (1996a) numa concepção envolvendo o fator tempo, o conjunto de alelos deve estar sendo compartilhado por grupos grandes de indivíduos, formando metapopulações.

Utilizando a abordagem proposta por Slatkin & Barton (1989) foi possível estabelecer o tamanho de vizinhança para *E. erythropappus* (Tabela 22). Este resultado indica que as unidades panmíticas ou vizinhanças, são de 42 indivíduos, ou seja, estes compõem os grupos parentais que trocam alelos ao acaso. Numa mesma unidade de área, a redução neste número de indivíduos pode levar a alterações na estrutura genética das populações em médio prazo, aumentando a divergência entre as vizinhanças, devido ao aumento interno dos níveis de endogamia. Restrições no fluxo de genes, com conseqüente redução do tamanho de vizinhança, podem resultar em deriva genética mais acentuada, queda dos níveis de heterozigidade, reduzindo a diversidade genética da espécie.



#### 4.9 Tamanho efetivo

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 consideradas. Frankel et al. (1996) atentam para as flutuações do tamanho populacional entre gerações, variação na fertilidade entre indivíduos e sobreposição de gerações.

A partir dos coeficientes de divergência genética entre populações ( $\hat{\theta}_p$ ), coeficientes de endogamia das populações e coeficientes de endogamia para o conjunto de populações, foram obtidas as estimativas de tamanho efetivo (Tabela 23). Os resultados mostram que os tamanhos efetivos estimados para cada população foram próximos do número de indivíduos amostrados. A estimativa do  $\hat{N}_e$  é feita em função dos índices de fixação ( $\hat{f}$ ) (Vencovsky, 1992) e, como estes se apresentaram negativos, porém, não diferentes de zero, podemos considerar que todas as populações estão em EHW (Tabela 19). Se o excesso de heterozigotos, indicado pelos índices de fixação negativos, tivesse sido mais expressivo, os indivíduos amostrados estariam representando geneticamente mais indivíduos da população, com valores de  $\hat{N}_e$  bem mais elevados, pois em condições de heterozigose, a representatividade dos indivíduos amostrados é maior (Sebbenn et al., 2003).

TABELA 23. Tamanho efetivo ( $\hat{N}_e$ ) e número de indivíduos ( $n$ ) das amostras de cinco populações naturais de *Eremanthus erythropappus*.

| Populações              | $\hat{N}_e$ | N   |
|-------------------------|-------------|-----|
| BM                      | 32          | 30  |
| BR                      | 33          | 30  |
| CR                      | 31          | 30  |
| MP                      | 33          | 30  |
| PB                      | 34          | 30  |
| Conjunto das Populações | 50          | 150 |

De acordo com o resultado obtido para o conjunto das populações de *E. erythropappus*, a coleta de sementes, para conservação *ex situ*, deverá contemplar, pelo menos, 50 árvores matrizes, garantindo, assim, a manutenção da variabilidade genética. Vencovsky (1987) considera que, para a coleta de sementes e conservação de germoplasma, é fundamental que se faça o controle gamético feminino, coletando-se sementes de um 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.

O conhecimento do tamanho efetivo populacional é, também, de grande importância para o planejamento da conservação *in situ*, pois a relação entre o tamanho efetivo e o tamanho da amostra ( $\hat{N}_e / n$ ) permite a estimativa da população mínima viável (PMV), correspondendo ao número de indivíduos necessários à população para a manutenção de sua integridade genética. Tomando-se como base os valores de  $\hat{N}_e$  (referência) iguais a 150 e 1.500 (Nunney



& Campbell, 1993), a PMV para o conjunto das populações é de 450 e 4.500 indivíduos, para a conservação a curto e longo prazo, respectivamente. Estes valores referem-se ao número mínimo de árvores que deverão ser mantidas, assegurando a manutenção dos níveis de variabilidade genética, para as populações aqui avaliadas.

#### 4.10 Marcadores RAPD

Marcadores RAPD também foram utilizados para avaliar os níveis de variação genética entre e dentro de populações naturais de *Eremanthus erythropappus*. Uma das razões para a escolha desse tipo de marcador deve-se a não existência de informações sobre a sequência de DNA dessa espécie. Portanto, a técnica de RAPD torna-se uma ferramenta mais acessível, quando comparada a outras técnicas baseadas no polimorfismo de DNA, para desenvolver esse tipo de estudo.

##### 4.10.1 Seleção dos *primers*

Os critérios para a seleção dos *primers* utilizados para o estudo da diversidade e estrutura genética de *E. erythropappus* foram o perfil de amplificação, a repetibilidade e a nitidez das bandas. Oito *primers* foram selecionados e produziram 42 bandas polimórficas (Tabela 24). Os *primers* utilizados revelaram de 3 a 8 locos polimórficos e, em média, cada *primer* produziu cerca de 5,3 locos polimórficos. Este número é próximo ao encontrado por Estopa (2003), que obteve 5,6 locos polimórficos por *primer*, estudando três populações naturais de *E. erythropappus*. No entanto, estes números são inferiores ao obtido por Freitas (2001) no estudo genético de *Eremanthus erythropappus*, cujos *primers* produziram, em média, 9,9 locos polimórficos.

Observando os perfis de amplificação dos 150 indivíduos amostrados, nota-se que nenhum foi igual a outro, evidenciando a existência de variação genética nas populações avaliadas. Na Figura 15, observa-se o perfil do *primer* OPX-06.

Tabela 24. Seqüência dos *primers* selecionados para *Eremanthus erythropappus* e o padrão de polimorfismo.

| <i>Primer</i> | Seqüência<br>5' - 3' | Número de<br>locos obtidos | Número de locos<br>polimórficos | Porcentagem de<br>Polimorfismo (%) |
|---------------|----------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| OPO-10        | CCGAACACGG           | 6                          | 4                               | 66,7                               |
| OPN-06        | GAGACGCACA           | 7                          | 3                               | 42,8                               |
| OPN-08        | ACCTCAGCTC           | 8                          | 6                               | 75,0                               |
| OPN-09        | TGCCGGCTTG           | 7                          | 5                               | 71,4                               |
| OPN-14        | AAGCGACCTG           | 6                          | 5                               | 83,3                               |
| OPX-06        | ACGCCAGAGG           | 7                          | 5                               | 71,4                               |
| OPX-14        | ACAGGTGCTG           | 7                          | 6                               | 85,7                               |
| OPX-15        | CAGACAAGCC           | 9                          | 8                               | 88,9                               |
| Total         |                      | 56                         | 42                              | 75,0                               |



FIGURA 15. Perfil de um gel de RAPD utilizando o *primer* OPX-06 em indivíduos de *Eremanthus erythropappus*.

#### 4.10.2 Diversidade genética intrapopulacional

Os valores estimados para os índices de diversidade genética intrapopulacionais encontram-se na Tabela 25. Os resultados mostram que não ocorreram diferenças significativas para os parâmetros genéticos estimados entre

as cinco populações de *E. erythropappus* avaliadas. As porcentagens de polimorfismo ( $\hat{P}$ ) observadas foram bastante similares entre as populações, variando de 90,48 a 92,86 %. Estes valores foram mais elevados do que os obtidos por Freitas (2001), que relatou estimativas de polimorfismo variando de 54,5 a 70,7% em oito populações de *Eremanthus erythropappus*. O número de alelos observados ( $\hat{n}_a$ ) variou de 1,90 a 1,93, enquanto o número de alelos efetivos ( $\hat{n}_e$ ) variou de 1,57 a 1,64, entre as cinco populações de *E. erythropappus* avaliadas (Tabela 25). De acordo com o desvio padrão apresentado para as estimativas de  $\hat{n}_a$  e de  $\hat{n}_e$ , nenhuma população diferenciou-se das demais. A diversidade genética de Nei ( $\hat{H}_e$ ) variou de 0,335 (população BM) a 0,367 (população BR), não diferindo entre si, de acordo com o desvio padrão. Estes valores de  $\hat{H}_e$  foram próximos aos obtidos por Estopa (2003), que observou valores de  $\hat{H}_e$  variando de 0,299 a 0,333 em outras três populações naturais de *E. erythropappus*. As estimativas de  $\hat{H}_e$ , encontradas nesse estudo, podem ser consideradas maiores quando comparadas a outras espécies arbóreas como *Trichilia pallida* Swartz ( $\hat{H}_e$  variando de 0,27 a 0,33) (Zimback et al., 2004) e *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. ( $\hat{H}_e$  médio de 0,287) (Torezan et al., 2005), evidenciando altos níveis de variação intraespecífica nas populações de *E. erythropappus* estudadas. Os valores estimados para o índice de Shannon ( $\hat{H}_o$ ) evidenciaram a alta diversidade genética dentro das populações de *E. erythropappus* analisadas, variando de 0,498 a 0,539. Estes valores foram semelhantes aos obtidos para outras populações, dessa mesma espécie, cujo  $\hat{H}_o$  variou de 0,382 a 0,487, em estudo realizado por Freitas (2001). Os desvios padrões apresentados para as estimativas de  $\hat{H}_o$  indicam

níveis similares de diversidade genética entre as diferentes populações. A existência de alta diversidade genética dentro das populações naturais de *E. erythropappus* é confirmada quando se comparam os valores do índice de Shannon obtidos no presente estudo com aqueles encontrados para outras espécies arbóreas, nos quais foram utilizadas metodologias similares. Lacerda et al. (2001) observaram valores de  $\hat{H}_o$  variando de 0,301 a 0,367 para *Plathymenia reticulata*. Torezan et al. (2005) obtiveram  $\hat{H}_o$  igual a 0,410 para indivíduos adultos de *Aspidosperma polyneuron*. Tais comparações, juntamente com o fato de que não foram observados indivíduos geneticamente semelhantes, considerando os marcadores RAPD, revelam forte evidência de que a espécie *E. erythropappus* apresenta níveis altos de variabilidade genética intrapopulacional.

TABELA 25. Parâmetros genéticos populacionais obtidos por meio de 42 marcadores RAPD para cinco populações naturais de *Eremanthus erythropappus*.  $\hat{H}_e$ : diversidade genética de Nei;  $\hat{H}_o$ : índice de Shannon de diversidade fenotípica;  $\hat{n}_a$ : número de alelos observados;  $\hat{n}_e$ : número de alelos efetivos e  $\hat{P}$ : porcentagem de locos polimórficos.

| Populações | $\hat{P}$ | $\hat{H}_e$      | $\hat{H}_o$      |
|------------|-----------|------------------|------------------|
| BM         | 90,48     | 0,335<br>(0,152) | 0,498<br>(0,205) |
| BR         | 92,86     | 0,367<br>(0,135) | 0,539<br>(0,181) |
| CR         | 90,48     | 0,349<br>(0,156) | 0,514<br>(0,208) |
| MP         | 90,48     | 0,352<br>(0,155) | 0,517<br>(0,207) |
| PB         | 90,48     | 0,359<br>(0,148) | 0,526<br>(0,201) |

( ): desvio padrão

#### **4.10.2.1 Similaridade genética intrapopulacional**

As similaridades genéticas entre os genótipos de cada população de *E. erythropappus*, calculadas com base no coeficiente de Jaccard e agrupadas pelo método UPGMA, foram representadas graficamente, utilizando-se dendrogramas. Nas cinco populações avaliadas os marcadores RAPD possibilitaram a discriminação de diferentes genótipos, formando grupos com números distintos de genótipos. O agrupamento dos indivíduos de *E. erythropappus* da população BM é apresentado na Figura 16. Considerando um nível de similaridade genética de 50%, os genótipos foram agrupados em cinco grupos distintos, como podem ser vistos na Tabela 26. Nesta população (BM) indivíduos que apresentaram maior similaridade genética foram os indivíduos 03 e 04 (82%). A importância desses resultados reside no fato de que estes nos indicam quais são os genótipos mais divergentes dentro de cada população, podendo servir de orientação na escolha dos parentais para os cruzamentos realizados em programas de melhoramento genético.

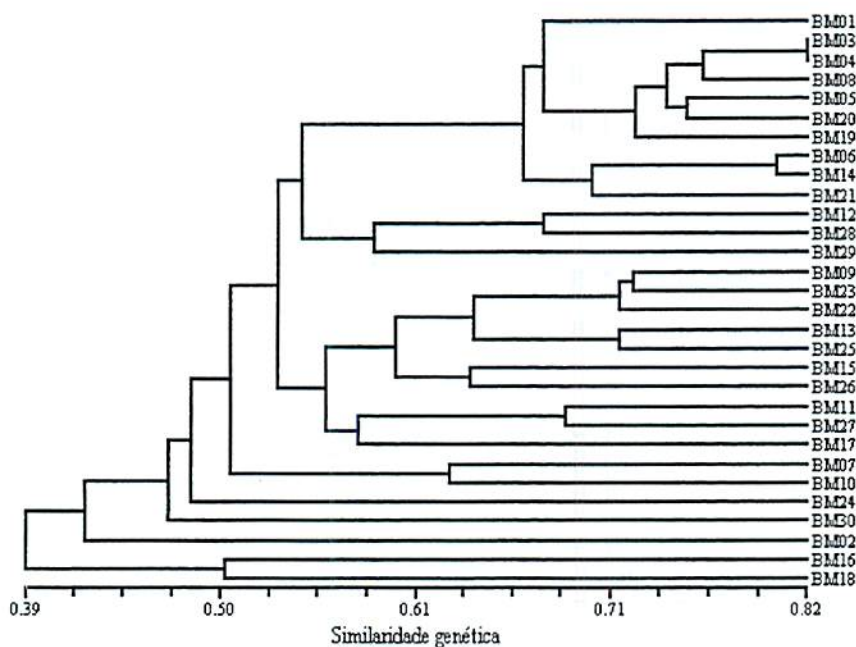


FIGURA 16. Dendrograma representativo das similaridades genéticas entre os indivíduos de *Eremanthus erythropappus* da população BM, utilizando o método UPGMA.

TABELA 26. Agrupamento dos genótipos de *Eremanthus erythropappus* provenientes da população BM, discriminados a 50% de similaridade genética.

| Grupo | Indivíduos   |
|-------|--|
| I     | 16 e 18  |
| II    | 2  |
| III   | 30   |
| IV    | 24   |
| V     | VI A: 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 22, 23, 25, 26 e 27<br>VI B: 1, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 28 e 29 |

Para a população BR o agrupamento dos genótipos, de acordo com a matriz de similaridade genética, está representado na Figura 17. Separando-se os grupos a 55,6% de similaridade genética, foram obtidos quatro grupos distintos (Tabela 27). Na população BR a similaridade genética entre os 30 indivíduos analisados variou de 0,53 a 0,80. Os indivíduos 24 e 29 apresentaram o maior nível de similaridade genética (80%), enquanto que os indivíduos 1 e 26 foram os mais divergentes geneticamente.

TABELA 27. Agrupamento dos genótipos de *Eremanthus erythropappus* provenientes da população BR, discriminados a 55,6% de similaridade genética.

| Grupo | Indivíduos                                 |
|-------|--|
| I     | 19, 22, 24, 26, 27, 28, 29 e 30            |
| II    | 16 e 23                                    |
| III   | 3, 4, 5, 6, 14, 15, 18 e 25                |
| IV    | 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 20 e 21 |



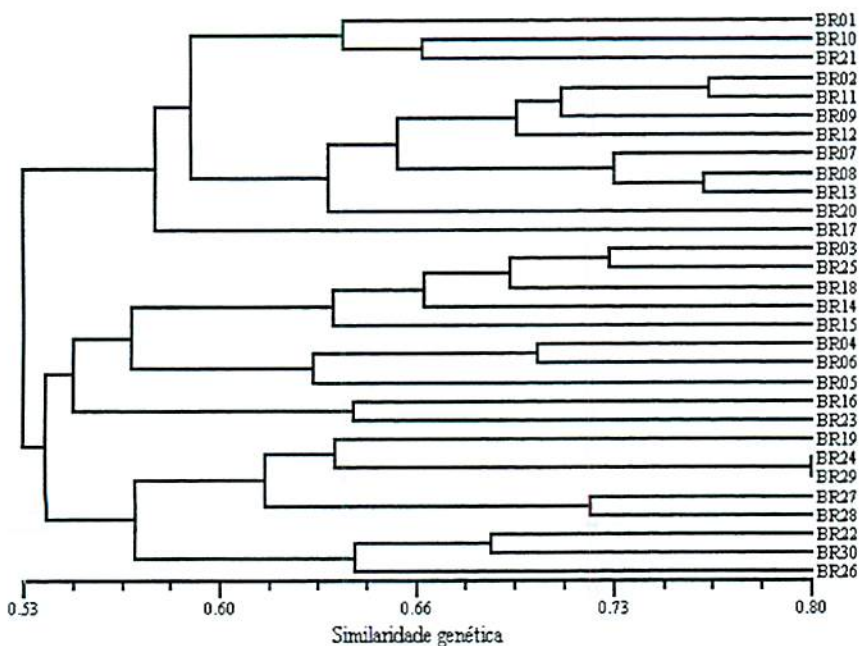


FIGURA 17. Dendrograma representativo das similaridades genéticas entre os indivíduos de *Eremanthus erythropappus* da população BR, utilizando o método UPGMA.

A população CR apresentou seis grupos distintos (Tabela 28), separados a 48,5% de similaridade genética. O agrupamento dos indivíduos obtido a partir da matriz de similaridade genética está representado na Figura 18. Os indivíduos 03 e 08 apresentaram 84% de similaridade genética, enquanto que os indivíduos mais divergentes geneticamente foram os 01 e 04 (65% de divergência genética).

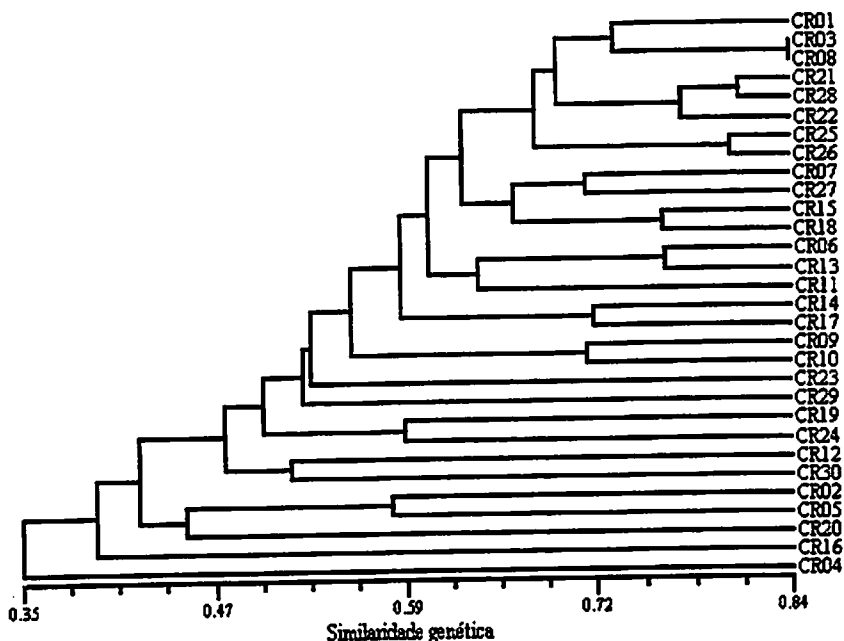


FIGURA 18. Dendrograma representativo das similaridades genéticas entre os indivíduos de *Eremanthus erythropappus* da população CR, utilizando o método UPGMA.

TABELA 28. Agrupamento dos genótipos de *Eremanthus erythropappus* provenientes da população CR, discriminados a 48,5% de similaridade genética.

| Grupo | Indivíduos  |
|-------|---|
| I     | 4   |
| II    | 16  |
| III   | 20  |
| IV    | 2 e 5   |
| V     | 12 e 30   |
|       | VIA: 19 e 24  |
| VI    | VI B: 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28 e 29 |

Na população MP dois grupos de indivíduos apresentaram alta similaridade genética. Um grupo formado pelos indivíduos 02 e 11 e outro formado pelos indivíduos 06 e 24, ambos similares a 74%, como podem ser vistos na Figura 19. Considerando todos os indivíduos da população MP, foram formados seis grupos a 52,3% de similaridade genética (Tabela 29). Os indivíduos mais divergentes geneticamente foram o 01 e 27, com 59% de divergência entre eles.

TABELA 29. Agrupamento dos genótipos de *Eremanthus erythropappus* provenientes da população MP, discriminados a 52,3% de similaridade genética.

| Grupo | Indivíduos  |
|-------|---|
| I     | 27  |
| II    | 22, 26 e 28   |
| III   | 20, 23 e 25   |
| IV    | 18 e 21   |
| V     | 29  |
| VI    | VI A: 6, 9, 13, 14, 17 e 24<br>VI B: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 19 e 30 |

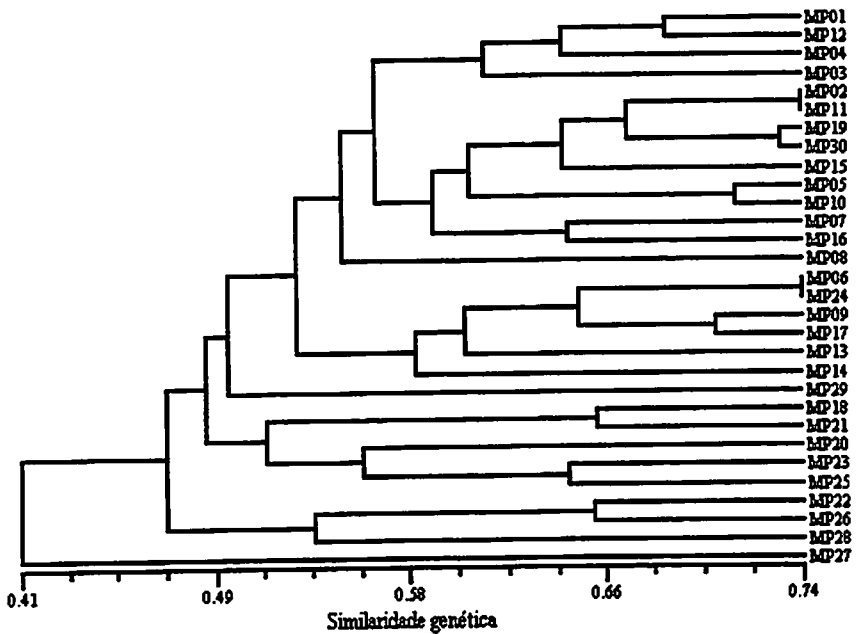


FIGURA 19. Dendrograma representativo das similaridades genéticas entre os indivíduos de *Eremanthus erythropappus* da população MP, utilizando o método UPGMA.

As similaridades genéticas obtidas para a população PB estão representadas na Figura 20. Os indivíduos desta população foram agrupados a 53,1% de similaridade, constituindo cinco grupos (Tabela 30). Os indivíduos mais similares geneticamente foram o 07 e 08 (78%) e os indivíduos 01 e 28 apresentaram maior divergência genética (57%).

Dentre as cinco populações de *E. erythropappus*, estudadas via marcadores RAPDs, a população CR foi a que apresentou maior divergência genética entre os indivíduos (65%), ao passo que, na população BR, todos os indivíduos analisados foram similares a 53%. Portanto, os indivíduos da população BR apresentaram divergência genética menor (47%) quando comparados com os indivíduos das demais populações. Os resultados obtidos

neste estudo demonstraram que em todas as populações existe variabilidade genética, com genótipos apresentando de 0,35 a 0,84 de similaridade genética. Os valores de similaridade genética observados foram semelhantes aos valores obtidos por Estopa (2003) estudando outras três populações de *E. erythropappus* localizadas no sul de Minas Gerais. A partir desses resultados, as cinco populações naturais de *E. erythropappus*, aqui avaliadas, podem ser consideradas como fonte de material genético para programas de melhoramento genético da espécie. A informação gerada a respeito dos indivíduos mais similares ou mais divergentes geneticamente pode ser de grande valor, especialmente se o objetivo do programa de melhoramento for a ampliação da base genética dessa espécie. Além disso, essas populações devem ser incluídas em programas de conservação genética da espécie, devido a existência de considerável variabilidade genética intrapopulacional.

TABELA 30. Agrupamento dos genótipos de *Eremanthus erythropappus* provenientes da população PB, discriminados a 53,1% de similaridade genética.

| Grupo | Indivíduos  |
|-------|---|
| I     | 27 e 28   |
| II    | 18  |
| III   | 30  |
| IV    | 15 e 19   |
| V     | V A: 14,16,20,21,22 e 24<br>V B: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 23, 25, 26 e 29 |

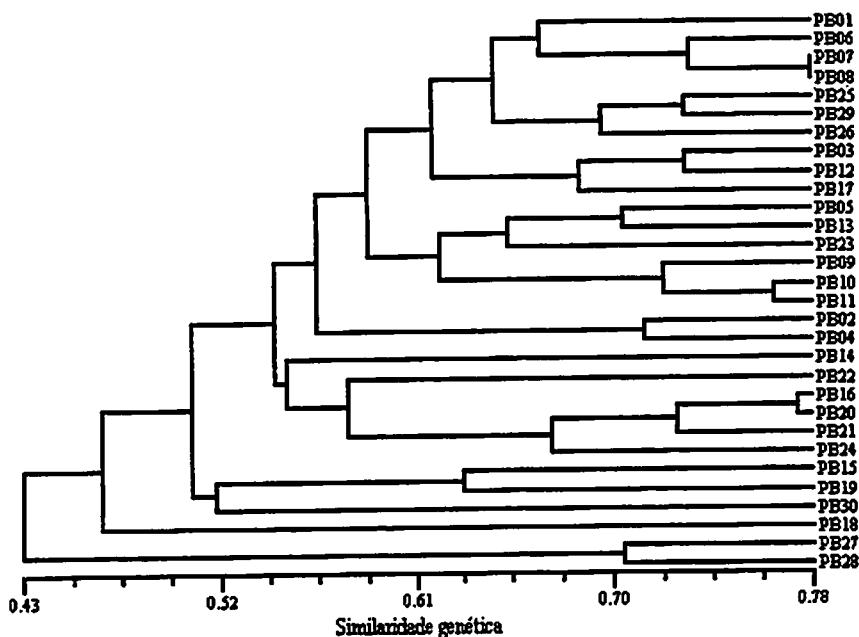


FIGURA 20. Dendrograma representativo das similaridades genéticas entre os indivíduos de *Eremanthus erythropappus* da população PB, utilizando o método UPGMA.

#### 4.10.3 Estrutura genética por marcadores RAPD

O índice de Shannon e a análise de variância molecular (AMOVA) possibilitaram o conhecimento da distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações naturais de *E. erythropappus*. O índice de Shannon revelou que 12,2% da variação foi devida à diferenças entre populações e 87,8% foi devida à diferenças entre indivíduos dentro das populações (Tabela 31). Observou-se que a subdivisão da diversidade genética variou entre os diferentes *primers*. O *primer* OPN-14, por exemplo, detectou apenas 7,9% da variação entre populações, enquanto que o *primer* OPN-16 detectou 16,7%, mostrando

que o emprego de vários *primers* resulta em uma melhor estimativa desse parâmetro.

TABELA 31. Partição da diversidade genética (índice de Shannon) entre e dentro de populações de *Eremanthus erythropappus* para 8 *primers* aleatórios.

| <i>Primer</i> | $\hat{H}_{pop}$ | $\hat{H}_{sp}$ | $\hat{H}_{pop} / \hat{H}_{sp}$ | $(\hat{H}_{sp} - \hat{H}_{pop}) / \hat{H}_{sp}$ |
|---------------|-----------------|----------------|--------------------------------|---|
| OPO-10        | 0,474           | 0,541          | 0,877                          | 0,123   |
| OPN-06        | 0,483           | 0,579          | 0,833                          | 0,167   |
| OPN-08        | 0,554           | 0,627          | 0,884                          | 0,116   |
| OPN-09        | 0,495           | 0,558          | 0,886                          | 0,114   |
| OPN-14        | 0,550           | 0,598          | 0,921                          | 0,079   |
| OPX-06        | 0,517           | 0,592          | 0,873                          | 0,127   |
| OPX-14        | 0,543           | 0,605          | 0,897                          | 0,103   |
| OPX-15        | 0,506           | 0,593          | 0,854                          | 0,146   |
| <b>Média</b>  | <b>0,515</b>    | <b>0,587</b>   | <b>0,878</b>                   | <b>0,122</b>                                    |

A AMOVA, com base nos dados de 42 locos avaliados, mostrou que 87,62% da variabilidade genética de *E. erythropappus* está presente dentro de populações e 12,38% entre populações, sendo o valor de  $\hat{\phi}_{ST}$  igual a 0,1238 (Tabela 32). Trabalhos como os de Hamrick & Loveless (1989) e Loveless & Hamrick (1987) mostraram que as espécies arbóreas tropicais tendem a apresentar altos níveis de variabilidade genética dentro de suas populações e, portanto, baixa divergência entre populações. Estudos mais recentes sobre a estrutura genética de arbóreas tropicais têm confirmado essa hipótese. Gillies et al. (1999) estudando a diversidade genética de *Swietenia macrophylla* King. por marcadores RAPD, observaram que 87,43% da variabilidade genética da espécie encontram-se dentro de populações, 12,01% entre populações dentro de regiões e 0,57 entre regiões. Lacerda et al. (2001) observaram que 12,3% e 16% da variação genética de *Plathymenia reticulata* podem ser atribuídas a diferenças entre populações, de acordo com a AMOVA e índice de Shannon,



respectivamente. Os resultados de estrutura genética obtidos no presente estudo podem ser comparados aos obtidos para esta última espécie, pois a *P. reticulata* possui características semelhantes à *E. erythropappus*, como a alta capacidade de dispersão de sementes e a provável polinização por abelhas.

Utilizando a metodologia proposta por Nei (1978), Zimback et al. (2004) relataram que 12,5% da variabilidade genética de *Trichilia pallida* está contida entre suas populações. Em populações de *Eugenia dysenterica*, Zucchi (2002) observou uma divergência genética de 27,03% entre dez populações da espécie, acessada por marcadores RAPD. Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com o esperado para espécies arbóreas, ou seja, eles indicam que as populações naturais de *E. erythropappus* exibem consideráveis níveis de variabilidade genética dentro de suas populações (87,62%) e níveis moderados de divergência entre populações (12,38%).

Tabela 32. Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) para 150 indivíduos de cinco populações de *Eremanthus erythropappus*.

| Fonte de variação | GL  | SQ       | Componentes de variância | Porcentagem de variação | P      |
|-------------------|-----|----------|--------------------------|-------------------------|--------|
| Entre populações  | 4   | 160.627  | 1.08308                  | 12.38                   | <0,001 |
| Dentro populações | 145 | 1111.333 | 7.66437                  | 87.62                   | <0,001 |
| Total             | 149 | 1271.960 | 8.74744                  |                         |        |

Observa-se que as duas metodologias empregadas para obter a partição da variabilidade genética de *E. erythropappus* nesse estudo, apresentaram resultados semelhantes. Pela partição da variabilidade, utilizando o índice de Shannon, a divergência genética entre populações foi estimada em 12,20%

(Tabela 31), enquanto que, com base na AMOVA, o  $\hat{\phi}_{ST}$  foi estimado em 12,38%. Dessa forma, pode-se concluir que houve concordância entre os resultados derivados de ambos os métodos. Comparando os resultados obtidos no presente estudo com aqueles relatados por Freitas (2001) e por Estopa (2003), para esta mesma espécie, nota-se que os valores de divergência genética, entre as populações aqui analisadas, foram mais baixos do que aqueles observados nos referidos trabalhos. Freitas (2001) encontrou valores de divergência de 14,3% e 17,8% entre oito populações de *E. erythropappus*, utilizando o índice de Shannon e AMOVA, respectivamente. No entanto, além das populações estudadas por Freitas (2001) serem diferentes das populações avaliadas no presente trabalho, elas estão distribuídas em áreas de mata e candeial, o que pôde, provavelmente, ter contribuído para uma maior divergência genética entre populações. A divergência genética obtida por Estopa (2003) para três populações de *E. erythropappus* foi bem mais elevada ( $\hat{G}_{ST}$  igual a 21,29%) do que a observada no presente estudo. No entanto, esses resultados referem-se a outras populações e, ainda, a divergência foi obtida pelas estimativas da diversidade genética de Nei (1987), diferente da metodologia empregada nesse estudo. Apesar das diferenças na magnitude da divergência genética entre populações, os resultados obtidos podem ser considerados congruentes, evidenciando que a maior parte da variabilidade genética da espécie *E. erythropappus* está contida dentro de suas populações. O conhecimento dessa distribuição da variabilidade genética é de essencial para a adoção de estratégias realmente efetivas de conservação *in situ* e *ex situ*, além de fornecer informações fundamentais para o sucesso de programas de manejo e melhoramento genético.

O valor da divergência genética entre as populações naturais de *E. erythropappus*, estimado por marcadores RAPDs ( $\hat{\phi}_{ST} = 0,1238$ ), pode ser considerado moderado. De acordo com Wright (1978), valores de divergência

entre 0 e 0,05 indicam baixa diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 indicam moderada diferenciação e entre 0,15 e 0,25 a diferenciação genética entre populações pode ser considerada elevada. O valor estimado de  $\hat{\phi}_{ST}$  nesse estudo (0,1238) está de acordo com os valores relatados por Hamrick & Godt (1989) para espécies com ampla distribuição geográfica, de fecundação cruzada e dispersas pelo vento ( $\hat{\phi}_{ST}$  variando de 0,10 a 0,20). Os valores de  $\hat{\phi}_{ST}$  obtidos para cada par de populações indicam que estas podem ser consideradas diferentes uma das outras, pois todos os valores foram significativos ( $P < 0,001$ ).

As maiores diferenciações genéticas foram encontradas entre as populações BR e MP (0,166) e entre MP e PB (0,152). Esses níveis moderados de variação genética entre populações refletiram nas estimativas do fluxo gênico entre elas. O fluxo gênico estimado a partir da divergência entre as populações foi de 1,77 migrantes/geração, variando de 1,26 a 3,63 (Tabela 33). Os valores estimados para o fluxo gênico foram similares aos obtidos por Freitas (2001) entre oito populações naturais de *Vanillosmopsis erythropappa* ( $\hat{N}m$  de 1,49). As estimativas de  $\hat{N}m$  também foram semelhantes às obtidas por Lacerda et al. (2001) para *P. reticulata*, com a maioria dos valores de  $\hat{N}m$  variando entre 1,2 a 3,5. Hartl & Clark (1997) sugerem que valores de  $\hat{N}m$  acima de 4,0 indicam que as populações se comportam como uma única população panmítica. No entanto, o único valor de fluxo gênico mais próximo de 4,0 foi o encontrado entre as populações BM e BR (3,63). Como estas duas populações ocorrem muito próximas geograficamente (2,6 km de distância), possivelmente elas se comportam (ou se comportavam, num passado não muito distante) como uma população panmítica, realizando trocas alélicas.

TABELA 33. Valores de  $\hat{\phi}_{ST}$  estimados para cada um dos pares de populações (abaixo da diagonal) e número de migrantes ( $\hat{Nm}$ ) entre populações (acima da diagonal) de *Eremanthus erythropappus*.

| População | BM    | BR    | CR    | MP    | PB   |
|-----------|-------|-------|-------|-------|------|
| BM        | -     | 3,63  | 1,73  | 1,62  | 1,54 |
| BR        | 0,064 | -     | 1,64  | 1,26  | 2,17 |
| CR        | 0,126 | 0,132 | -     | 2,17  | 2,06 |
| MP        | 0,134 | 0,166 | 0,103 | -     | 1,40 |
| PB        | 0,139 | 0,103 | 0,108 | 0,152 | -    |

As cinco populações de *E. erythropappus* foram agrupadas pelo método UPGMA, de acordo com a matriz de divergência genética (Figura 21). A correlação cofenética do agrupamento UPGMA desta matriz foi elevada ( $r = 0,804$ ). A análise do agrupamento revela que as populações BM e BR são mais semelhantes, formando um grupo distinto dos demais. O teste de Mantel, utilizado para correlacionar a matriz de divergência genética e a matriz de distâncias geográficas, revelou valores significativos ( $r = 0,572$ ,  $P = 0,0247$ ), sugerindo um padrão espacial de estruturação dessas populações. Esses resultados podem indicar que as populações estão sofrendo os efeitos da deriva genética, devido à fragmentação e à diminuição do fluxo gênico, causada pelo isolamento por distância.

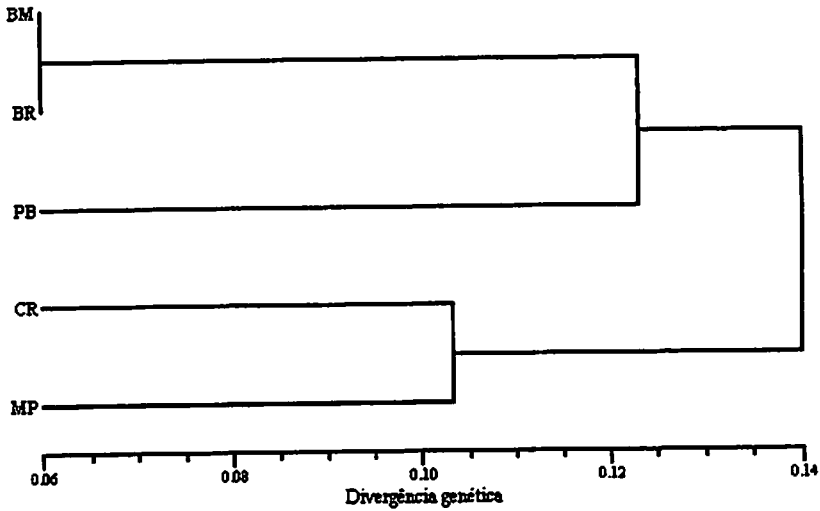


FIGURA 21. Dendrograma de cinco populações naturais de *Eremanthus erythropappus*, definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base nas divergências genéticas ( $\hat{\phi}_{ST}$ ) obtidas pela AMOVA.

#### 4.11 Considerações finais

A estrutura genética de *E. erythropappus* foi analisada com base em duas classes distintas de marcadores: isoenzimas e RAPD. Ambos marcadores se mostraram adequados para esse tipo de estudo. A técnica de isoenzimas pode ser mais laboriosa e por isso, demandar mais tempo para a obtenção de resultados. Dessa forma, os marcadores RAPD podem utilizados para fornecer dados com maior rapidez, gerando informações sobre a variabilidade genética das populações e sobre a divergência genética entre populações e indivíduos. Por outro lado, a utilização dos marcadores RAPD pode ser limitada devido à sua



herança dominante, o que não ocorre com as isoenzimas, cuja expressão codominante permite a diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos. Assim, os marcadores isoenzimáticos podem ser mais adequados aos estudos sobre o sistema reprodutivo e o fluxo de genes.

A espécie *E. erythropappus* apresentou elevados índices de diversidade genética, revelados tanto por marcadores isoenzimáticos quanto por marcadores RAPD. Ambos os tipos de marcadores indicaram que a maior parte da variabilidade genética desta espécie encontra-se distribuída dentro de suas populações naturais.

Os resultados sobre o sistema reprodutivo indicaram que *E. erythropappus* reproduz-se por cruzamentos. No entanto, como ocorreram diferenças significativas nas taxas de cruzamentos individuais, o sistema de reprodução desta espécie deve ser considerado misto, com ocorrência de cruzamentos e autofecundação. Houve indicativos de cruzamentos entre indivíduos aparentados, pois as taxas de cruzamentos unilocos foram menores que as taxas multilocos. As correlações de paternidade foram elevadas, indicando a ocorrência de cruzamentos biparentais nas populações naturais de *E. erythropappus*. Os coeficientes de coancestria estimados nas progênies foram superiores ao esperado em progênies de meio-irmãos.

A estimativa de tamanho efetivo de variância permitiu estimar o número de matrizes necessário para reter um  $N_e$  de 150 para *E. erythropappus*. Este número foi de 63 e 55 matrizes para as populações BM e PB, respectivamente. Desta forma, cerca de 60 seria o número mínimo de matrizes a serem coletadas para a conservação genética *ex situ*, em curto prazo, desta espécie, nas populações avaliadas. Considerando  $N_{e(referência)}$  de 150 e 1.500 (Nunney & Campbell, 1993) a população mínima viável para a conservação de *E. erythropappus*, em curto e longo prazo, deverá ser 450 e 4.500 indivíduos, respectivamente.

A definição do número mínimo de árvores porta-sementes a ser mantido em uma área sob manejo deve ser feito com base no tamanho efetivo da população. Considerando o tamanho efetivo médio das populações avaliadas nesse estudo, são necessárias 139 árvores porta-sementes por hectare, para assegurar um tamanho efetivo de 150. Essas árvores devem estar em plena fase reprodutiva, distribuídas de maneira uniforme por toda a área. Com o intuito de evitar a ocorrência de seleção disgênica, as árvores remanescentes devem apresentar genótipos superiores, além de um bom aspecto fitossanitário.

A análise da estrutura genética espacial indicou que *E. erythropappus* apresenta distribuição aleatória dos genótipos. No entanto, uma certa estruturação foi observada em duas das cinco populações avaliadas. A presença de estruturação espacial deve ser considerada no planejamento da coleta de sementes e de manejo.



## 5 CONCLUSÕES

Os estudos realizados nas populações naturais de *Eremanthus erythropappus* possibilitaram chegar às seguintes conclusões:

- A espécie apresenta altos níveis de variabilidade genética, caracterizando seu potencial em programas de melhoramento genético, de conservação genética *in situ* e *ex situ* e de manejo florestal;
- A maior parte da variabilidade genética da espécie encontra-se dentro de suas populações naturais;
- Não foi detectada a ocorrência de endogamia dentro das populações;
- O fluxo de genes encontrado entre as populações foi elevado, caracterizando baixa divergência genética entre elas;
- A espécie é alógama, reproduzindo-se predominantemente por cruzamentos;
- Os cruzamentos nas duas populações analisadas não ocorreram de maneira aleatória, sendo uma expressiva proporção das progênies resultantes de cruzamentos biparentais;
- Nas populações de Baependi 2 (BR) e de Carrancas (CR) os indivíduos de *E. erythropappus* apresentam tendência à estruturação familiar. Nas demais populações (BM, MP e PB) os indivíduos se encontram distribuídos espacialmente de maneira aleatória;
- O número mínimo de matrizes para a coleta de sementes, visando a manutenção da variabilidade genética existente na espécie, é 60.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGAARD, J. E.; KRUTOVSKII, K. V.; STRAUSS, S. H. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiations among populations and races of Douglas-fir. *Heredity*, Essex, v. 81, n. 1, p. 69-78, July 1998.
- ALFENAS, A. C.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J. R.; ALONSO, S. K.; SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV, 1998. p. 85-114.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242 p.
- ALLARD, R. W. *Princípios de melhoramento genético das plantas*. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R.; GARAY, A. A. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer species. *Evolution*, Washington, v. 48, n. 2, p. 437-453, Apr. 1994.
- ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; FIGUEIRA, A. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (willd ex Spreng) shumm genetics and molecular. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 29, n. 3, p. 373-379, 2003.
- ARAÚJO, L. C. *Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip: sua exploração florestal. Rio de Janeiro: Escola nacional de Agronomia, 1944. 54 p.
- AYALA, F. J.; KIGER, J. A. *Modern genetics*. Menlo Park: The Benjamin Cummings, 1984. 789 p.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. *Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. San Diego: Academic Press, 1998. 666 p.
- BAWA, K. S. Effects of deforestation and forest fragmentation on genetic diversity in tropical tree populations. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GENETIC CONSERVATION AND PRODUCTION OF TROPICAL FOREST TREE SEED, 1994, Muak-lek, Saraburi, Thailand. *Proceedings...* Muak-lek,

Saraburi, Thailand: ASEAN – Candian Forest Tree Seed Center Project, 1994. p. 10-16.

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. (Ed.). **Rain forest regeneration and management**. Paris: UNESCO, 1990. p. 119-136.

BEKESSY, S. A.; ALLNUTT, T. R.; PREMOLI, A. C.; LARA, A.; ENNOS, R. A.; BURGMAN, M. A.; CORTES, M.; NEWTON, A. C. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. **Heredity**, Essex, v. 88, n. 4, p. 243-249, Apr. 2002.

BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.

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.; WEIR, B. S. Measuring genetic variability in plant population. In: TANSKLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plants genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983.

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. 201-328.

CÂNDIDO, J. F. **Cultura da candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip.)**. Viçosa: UFV, 1991. 7 p. (Boletim de extensão, 3).

CARDOSO, M. A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P. C. G.; OLIVEIRA, D. E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinea echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 601-608, May 1998.

CARLINI-GARCIA, L. A. **Uso do método de reamostragem bootstrap na estimação de parâmetros genéticos populacionais**. 2001. 162 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

- CARVALHO, D.; TORRES, G. A. **Marcadores moleculares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002.
- CAVALLI, S. S.; WINGE, H. Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre, RS: Editora UFRGS, 2003. p. 165-175.
- CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS – CETEC. **Ecofisiologia da candeia**. Belo Horizonte: SAT/CETEC, 1994. 104 p. (Relatório Técnico).
- CHAVES, M. M. F. **Descrição morfológica de sementes, de plântulas e de mudas de 10 espécies arbóreas pioneiras na microrregião de Viçosa, MG**. 1994. 108 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- CHAVES, M. M. F.; RAMALHO, R. da S. Estudos morfológicos em sementes, plântulas e mudas de duas espécies arbóreas pioneiras da família Asteraceae (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip e *Vernonia discolor* (Spreng.) Less). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 1996.
- CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Inheritance and linkage allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 34, n. 2/3, p. 142-148, 1985.
- CLARK, A. G.; LANIGAN, C. M. S. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. **Molecular Biology Evolution**, Lawrence, v. 10, n. 5, p. 1096-1111, Sept. 1993.
- CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, Arlington, v. 30, n. 12, p. 814-818, 1980.
- CLIFF, A. D.; ORD, J. K. **Spatial processes methods and applications**. London: Pion, 1981. 389 p.
- COCKERHAM, C. C. Variance of Gene Frequencies. **Evolution**, Washington, v. 23, n. 1, p. 72-84, Mar. 1969.
- COCKERHAM, C. C.; WEIR, B. S. Estimation of Gene Flow From F-Statistics. **Evolution**, Washington, v. 47, n. 3, p. 855-863, June 1993.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, Lawrence, v. 10, n. 2, p. 349-356, Feb. 2001.

**CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério da agricultura, 1931. v. 1, p. 432-433.

**COSTA, C. M. R.; HERRMANN, G.; MARTINS, C. S.; LINS, L. V.; LAMAS, I. R. (Org.). Biodiversidade em Minas Gerais: um Atlas para sua conservação.** Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 1998.

**CRISTINA, D. S. Estudo “in vitro” da atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de plantas brasileiras da família Compósitas (Asteraceae) e de alguns de seus constituintes.** 1989. 114 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

**CROW, J. F.; AOKI, K. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. Proceedings of the National Academic Science of United State America, Washington, v. 81, p. 6073-6077, 1984.**

**CROW, J. F.; KIMURA, M. A. An introduction to population genetics theory.** 1970. 591 p.

**DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS - Spatial Genetic Software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. Journal of Heredity, Cary, v. 92, n. 5, p. 447-448, Sept./Oct. 2001.**

**DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, Oxford, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.**

**EGUIARTE, L. E.; PEREZ-NASSER, N.; PINERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocarrum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. Heredity, Oxford, v. 69, n. 3, p. 217-228, Sept. 1992.**

**ELLSTRAND, N.; ELAM, E. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annual Review of Ecology and Systematics, Palo Alto, v. 24, p. 217-241, 1993.**

**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.; ALLARD, R. W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. *Genetics*, Austin, v. 121, n. 2, p. 369-377, Feb. 1989.

EPPERSON, B. K.; CHUNG, M. Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms within populations of *Pinus strobes* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, Columbus, v. 88, n. 6, p. 1006-1010, June 2001.

ESTOPA, R. A. **Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2003. 46 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. **Introdução à genética quantitativa**. Londres: Longman, 1996, 464 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.

FISHER, R. A. Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics*, New York, v. 11, p. 53-63, 1941.

FRANCESCHINELLI, E. V.; BAWA, K. S. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity*, Essex, v. 84, n. 1, p. 116-123, Jan. 2000.

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

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

FREITAS, V. L. O. **Variabilidade genética em *Vanillosmopsis erythropappa* Schlutz Bip. (Asteraceae) em áreas de candeial e de mata**. 2001. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.



FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. The use of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. (Ed.). **Molecular genetic approaches in conservation**. New York: Oxford University Press, 1996. p. 54-73.

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

GANDARA, F. B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento, e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrella fissilis* Vell. (Meliáceas)**. 1996. 69 p. Dissertação Mestrado – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isozyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 135-141, Aug. 1989.

GILLIES, A. C. M.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J.; NEWTON, A. C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J.; CORNELIUS, J. P. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**, Essex, v. 83, n. 6, p. 722-732, Dec. 1999.

GIUDICE-NETO, J. del. **Estrutura genética por isoenzimas em populações naturais de Jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog)**. 1999. p. 128. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

GRAUDAL, L.; KJAER, E.; THOMSEN, A.; LARSEN, A. B. Planning national programmes for conservation of forest genetic resources. **Technical note Danida**, Copenhagen, n. 48, p. 1-58, 1997.

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) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

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

HAIG, S. M.; RHYMER, J. M.; RECKEL, D. G. Population differentiation in randomly amplification polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers



*Picoides borealis*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 3, n. 6, p. 581-595, Dec. 1994.

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, n. 81, p. 1104-1111, 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**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 757-768, June 1996.

HAMRICK, J. L.; NASON, J. D. Gene flow in forest trees. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. p. 81-90.

HAMRICK, J. L. Gene flow and distribution of genetic variation in planta population. In: URBANSKA, K (Ed.). **Differentiation patteens in higher plants**. New York: Academic Press, 1987. p. 53-76

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. **Genetics and conservation**. Menlo Park: Califórnia: Benjamin Cummings Publishing Company, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, MA, Sinauer Associates, 1990. p. 43-63.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y. B. (Ed.). **The evolutionary ecology of plants**. Boulder: Westview Press, 1989. p. 129-146.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon Neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 395-399, Aug. 1991.

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.; VEKEMANS, X. **SPAGeDI 1. 0: a program for spatial pattern analysis of genetic diversity. Version for Windows 95. 2002.**

HARRIS, S. A. RAPDs in systematics – a useful methodology ? In: HOLLINGSWORTH, P. M. et al. (Ed.). **Molecular systematics and plant evolution.** London: Taylor and Francis, 1999. p. 211-228.

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.

HUANG, Q. Q.; TOMARU, N.; WANG, L. W.; OHBA, K. genetic control of isozyme variation in Masson Pine, *Pinus massoniana* Lamb. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, n. 5/6, p. 285-292, 1994.

HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchoë dactuloides* (Nutt.) Elgen). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 86, n. 8, p. 927-934, Sept. 1993.

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.

JENNINGS, S. B.; BROWN, N. D.; BOSHER, D. H.; WHITMORE, T. C.; LOPES, J. do C. A. Ecology provides a pragmatic solution to the maintenance of genetic diversity in sustainably managed tropical rain forests. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 154, p. 1-10, 2001.

KAGEYAMA, P. Y. Conservação “in situ” de recursos genéticos de plantas. **Silvicultura**, São Paulo, v. 11, n. 41, p. 7-37, 1987.

KAGEYAMA, P. Y.; CUNHA, G. C.; BARRETO, K. D.; GANDARA, F. B.; CAMARGO, F. R. A.; SEBBENN, A. M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 108-119, dez. 2003a.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF*, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia forestalis*, Piracicaba, n. 64, p. 93-107, dez. 2003b.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild population. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 17, n. 5, p. 230-241, 2002.

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.; CROW, J. F. The measurement of the effective population number. *Evolution*, Washington, v. 17, n. 3, p. 279-288, 1964.

KING, L. M.; SCHAAL, B. A. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution*, Washington, v. 43, n. 5, p. 1117-1119, aug. 1989.

KIRST, M. **Desenvolvimento de sistemas de genotipagem multilocos semi-automatizados, baseados em marcadores microssatélites, e sua aplicação em espécies do gênero *Eucalyptus*.** Viçosa, MG: UFV, 1990. 150 p.

LACERDA, C. M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Allemão na região semi-árida, Brasil. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 145-150, abr./jun. 2003.

LACERDA, C. M. B.; KAGEYAMA, P. Y.; FERRAZ, E. M. Diversidade genética em *Myracrodruon urundeuva* em duas situações antrópicas no semi-árido. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n. 55, p. 89-96, jun. 1999.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata*

(Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 1143-1152, May 2001.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

LANDE, R. Genetic and demography in biological conservation. **Science**, Washington, v. 241, n. 4872, p. 1455-1460, Sept. 1988.

LEE, S. L. Mating system parameters in a tropical tree species, *Shorea leprosula* Miq. (Dipterocarpaceae), from Malaysian Lowland dipterocarp forest. **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 4a, p. 693-702, Dec. 2000.

LEGENDRE, P. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? **Ecology**, Washington, v. 74, n. 6, p. 1659-1673, Sept. 1993.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 2875-2883, Nov. 2003.

LEWANDOWSKI, A. Inheritance and linkage of some allozymes in *Pinus armandii* Franch. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, n. 2, p. 79-82, 2000.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. GDA - genetic data analysis: version 1.0 (d12) for Windows. Albuquerque: The University of New Mexico, 1999. 39 p.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972.

LEWONTIN, R. C.; HUBB, J. L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, Austin, v. 54, p. 595-609, 1966.

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.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 29, p. 56-60, nov./dez. 2003.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Distribucion de la variacion en especies de arboles tropicales. **Revista Biologia Tropicales**, San Jose, v. 35, n. 1, p. 165-75, 1987.

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.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 91-99, 1994.

MALÉCOT, G. **Les mathématiques de l'hérédité**. Paris: Masson, 1948. 80 p.

MALTEZ, H. M. Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. – Apocynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecídua no Estado de São Paulo. 1997. 132 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, Campinas, SP.

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

METTLER, L. E.; GREGG, T. G. **Genética de populações e evolução**. São Paulo: Polígono/EDUSP, 1973. 262 p.

MITTON, J. B. The dynamic mating systems of conifers. In: Population genetics of forest trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON POPULATION GENETICS OF FOREST TREES, 1992, Dordrecht, 1992. **Proceeding...** Dordrecht: Kluwer Verlag, 1992. p. 197-216.

MORAES, M. L. T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon*

*urundeuva* F.F. & M.F. Allemão Anarcadiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler. 1992. 139 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1992.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Correlated mating in dioecious tropical tree species, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 16, p. 23, 2003.

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.

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 475-487, jul./set. 2004.

MORDEN, C. W.; LOEFFLER, W. Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 617-625, Apr. 1999.

MOURA, E. F. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 2003. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MURAWSKI, D. A.; BAWA, K. S. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 2, p. 155-160, Feb. 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, p. 167-174, 1991.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering-tree density: a test of predictions. **Biotropica**, Washington, v. 24, n. 1, p. 99-101, Feb. 1992.

MURCIA, C. Edge effects in fragment forests: implications for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 58-62, Feb. 1995.

- 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.
- NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, Cary, v. 88, p. 264-276, 1997.
- 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, June 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. *F*-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, New York, v. 41, n. 10, p. 225-233, Oct. 1977.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.
- NEI, M. **Molecular populations genetics and evolution**. Amsterdam: North-Holland Publishing, 1975.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 10, p. 5267-5273, 1979.
- 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.
- NEMAF, Núcleo de Estudos em Manejo Florestal. "Sistema de manejo para a Candeia (*Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus*). Disponível em: <[www.nucleoestudo.ufla.br/nemaf](http://www.nucleoestudo.ufla.br/nemaf)>. Acesso em: 10 jan. 2005.
- NOGUEIRA, D. C. F. **Atividade antiulcerogênica do óleo essencial e da fração rica em alfa-bisabolol, obtidos das espécies do gênero *Eremanthus***. 2000. 83 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Campinas, Campinas, SP.



NUNNEY, L.; CAMPBELL, K. A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. **Tree**, Victoria, v.8, n.7, p. 234-239, 1993.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1143-1155, May 2004.

O'MALLEY, D. M.; BAWA, K. S. Mating system of a topical rain forest tree species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 74, n. 8, p. 1143-1149. Aug. 1987.

OLIVEIRA FILHO, A. T.; CARVALHO, D. A.; FONTES, M. A. L.; VAN DEN BERG, E.; CURI, N.; CARVALHO, W. A. C. Variações estruturais do componente arbóreo de uma floresta semidecídua alto-montana na Chapada das Perdizes, Carrancas, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 291-309, abr./jun. 2004.

OLIVEIRA, A. F. **Estrutura genética de populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. a partir de isoenzimas**. 2000. p. 114. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

PALACIOS, C.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1107-1121, Dec. 1997.

PEDRALLI, G. Estrutura diamétrica, vertical e análise do crescimento da 'candeia' (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip) na Estação Ecológica do Tripuí, Ouro Preto – MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 301-306, abr./jun. 1997.

PÉREZ, T.; ALBORNOZ, J.; DOMINGUES, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 10, p. 1347-1357, Oct. 1998.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A. P.; SOUZA JR., C. L. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n. 20, p. 16-19, maio/jun. 2001.

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, 2004.

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.

RATNAM, W.; BOYLE, T. J. Effects of logging and others forms of harvesting on genetic diversity in humid tropical forests. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics.** Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. p. 115-123.

REIS, M. S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 4, p. 37-47, Dec. 1996a.

REIS, M. S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitreiro (*Euterpe edulis* MARTIUS).** 1996b. 210 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

RENAU-MORATA, B.; NEBAUER, S. G.; SALES, E.; ALLAINGUILLAUME, J.; CALIGARI, P.; SEGURA, J. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, n. 5, p. 875-884, May 2005.

RIBAS, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) B. Considerando diferentes estádios de vida. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 176-187, jun. 2004.

RIBAS, L. A.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em locos de isoenzimas de *Trema micrantha*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 73-81, mar. 2004.

- RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 418-424, Sept. 2004.
- RITLAND, K. A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. **Evolution**, Washington, v. 50, n. 3, p. 1062-1073, June 1996.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus Guttatus*. **Evolution**, Washington, v. 43, n. 4, p. 848-859, July 1989.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR. Version 1. 1.** Canada: University of Toronto, 1997.
- RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y. A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 71, n. 3, p. 371-384, 1985.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, Essex, v. 47, p. 35-52, Aug. 1981.
- RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira.** São Paulo: E. Edgard Blücher, 1981. 296 p.
- ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 329-380.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York, 1992. Version 1. 70.
- ROUSSET, F. Inbreeding and relatedness coefficients: what do they measures ? **Heredity**, Essex, v. 88, n. 5, p. 371-380, May 2002.
- RUGGIERO, M. V.; REUSCH, B. H.; PROCACCINI, G. Local genetic structure in a clonal dioecious angiosperm. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 957-967, Apr. 2005.
- SANTOS, E. M. G. **Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae).** 1994. p. 114. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SCHNEIDER, D. S.; ROESSLI, L.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000: a software for population genetics data analysis**. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory/University of Geneva, 2000.

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. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiáceas) a partir de isoenzimas**. 1997. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SEBBENN, A. M. Herança e ligação em locos de isoenzimas em *Genipa americana* L. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 65-72, mar. 2004.

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.; VENCOVSKY, R. Conservação genética *in situ* e numero de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 63, p. 13-22, jun. 2003.

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

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 58, p. 127-143, dez. 2000b.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em locos de isoenzimas em *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 57-63, mar. 2004.



- SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 19-26, mar. 2001.
- SETSUKO, S.; ISHIDA, K.; TOMARU, N. Size distribution and genetic structure in relation to clonal growth within a population of *Magnolia tomentosa* Thunb. (Magnoliaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 2645-2653, Sept. 2004.
- 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, A. C. da. **Variações genéticas em candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish): simbiose e desenvolvimento radicular e estabelecimento inicial em áreas degradadas**. 2003. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SILVA, E. F. **Caracterização edifica e fitossociologia e, áreas de ocorrência natural de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip)**. 2001. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- SILVA, J. M.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Autocorrelação espacial em população natural de *Terminalia argentea* Mart et Succ. no cerrado de Selvíria, MS. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 66, p. 94-99, dez. 2004.
- SLATKIN, M. Estimating level of gene flow in natural populations. **Genetics**, Austin, v. 99, p. 323-335, 1981.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.
- SLATKIN, M.; BARTON, N. H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, Washington, v. 43, n. 7, p. 1349-1368, Nov. 1989.
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973.

- SOKAL, R. R.; MENOZZI, P. Spatial autocorrelation of HLA frequencies in Europe support demic diffusion of early farmers. **American Naturalist**, Chicago, v. 119, n. 1, p. 1-17, Jan. 1982.
- SOKAL, R. R.; ODEN, N. L. Spatial autocorrelation in biology. I. Methodology. **Biology Journal Linnean Society**, London, v. 10, n. 2, p. 199-228, 1978.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). **Isoenzymes in plant biology**. Portland: dioscorides Press, 1989. p. 5-45.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, n. 5/6, p. 191-196, 2002.
- SOUZA, L. M. F. I. **Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru(SP) – Brasil**. 1997. p. 76. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St. -Hil. (Bombacaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 113-121, jan./mar. 2003.
- SQUILLACE, A. E. Average genetic correlations among offspring from open-pollinated forest trees. **Silva Genetica**, Frankfurt, v. 23, n. 1/2, p. 149-156, 1974.
- SUN, M.; RITLAND, K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. **Heredity**, Essex, v. 80, n. 2, p. 225-232, Feb. 1998.
- SURLES, S. E.; ARNOLD, J.; SCHNABEL, A.; HAMRICK, J. L.; BONGARTEN, B. C. Genetic relatedness in open-pollinated families of two leguminous tree species, *Robina pseudoacacia* L. and *Gleditsia triacanthos* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.80, n.1, p. 49-56, 1990.
- SWOFFORD, D. L.; SALANDER, R. B.; BIOSYS-1. A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. **Journal of Heredity**, Cary, v. 72, n. 4, p. 282-283, July/Aug. 1989.
- TELLES, M. P. C.; VALVA, F. D.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G. Caracterização genética de populações naturais de *araticunzeiro* (*Annona*

*crassiflora* Mart. – Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, jan./mar. 2003.

TOREZAN, J. M. D.; SOUZA, R. F.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; CAMARGO, E. H.; VANZELA, A. L. L. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 171-180, Apr./June 2005.

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

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 53-60, mar. 1992. CONGRESSO LATINO AMERICANO DE GENÉTICA, 10., 1992, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro, 1992.

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: ESALQ/USP, 1997. p. 233-234.

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

VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.17, n.3, p.349-351, 1994.

WANG, C. T.; LIN, T. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme, and estimation of outcrossing rate in a seed orchard of *Cunninghamia konishii* Hay. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, n. 1, p. 33-37, 1998.

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

WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, v. 35, p. 235-254, 1979.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating *F*-statistics for the analyses of population structure. **Evolution**, Washington, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.



WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, J. K.; RFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

WORKMAN, P.; NISWANDER, J. L. Population studies on southwestern Indian Tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. **American Journal of Human Genetic**, Chicago, v. 22, n. 1, p. 24-49, 1970.

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

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. v. 4, 423 p.

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

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

WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**, Austin, v. 6, p. 111-178, 1921.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, New York, v. 15, p. 395-420, 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* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Shanghai, v. 37, n. 1, p. 141-146, 1996.

YEH, F. C.; CHONG, D. K. X.; YANG, R. C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. **Journal of Heredity**, Cary, v. 86, n. 6, p. 454-460, Nov./Dec. 1995.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. p. 123-135.

YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 352 p.

ZANETTINI, M. H. B.; CAVALLI, S. S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre, RS: Editora UFRGS, 2003. p. 177-187.

ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. A.; MELLO JÚNIOR, J. R. S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 114-119, jun. 2004.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.