

Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos

Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic markers

Paulo Yoshio Kageyama
Alexandre Magno Sebbenn
Luciano Arruda Ribas
Flávio Bertin Gandara
Milene Castellen
Maria Beatriz Percim
Roland Vencovsky

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi procurar padrões no sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética de populações, entre espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. Foram amostradas árvores adultas e progênies em populações naturais de seis espécies de três diferentes estágios sucessionais: pioneiras (*Trema micrantha* e *Cecropia pachystachya*), secundárias (*Cedrela fissilis* e *Cariniana legalis*) e climáticas (*Maytenus aquifolia* e *Esenbeckia leiocarpa*). A taxa de cruzamento multiloco (\hat{i}_m) não apresentou nenhum padrão específico entre as espécies ou estágios sucessionais, exceto que as espécies pioneiras tendiam a apresentar taxas mais altas de cruzamentos entre indivíduos parentes (variação de 0,071 a 0,199), do que as de outros estágios sucessionais. Todas as espécies em que o sistema de reprodução foi avaliado revelaram desvios dos cruzamentos aleatórios, sendo que as progênies de *T. micrantha* e *E. leiocarpa* apresentaram altos valores de correlação de paternidade (\hat{r}_p), sugerindo a existência de alta proporção de irmãos-completos. Também não foram observados padrões claros na distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações para as espécies dos diferentes estágios sucessionais. O que se observou, foi que a estrutura genética dessas espécies estava associada a padrões reprodutivos e demográficos dentro das populações, em que espécies que apresentam maiores taxas de cruzamento, distribuição agregada e alta densidade populacional tinham menor divergência entre populações do que as espécies com maiores taxas de autofecundação e baixa densidade populacional.

PALAVRAS-CHAVE: Sistema de reprodução, Estrutura genética, Espécies arbóreas tropicais

ABSTRACT: The aim this paper was to determine the pattern of mating system, genetic diversity and genetic structure of tropical tree species from different successional stages by using genetic markers. Adult trees and families of natural population were sampled of six species of three successional stages: pioneers (*Trema micrantha* and *Cecropia pachystachya*),

secondary (*Cedrela fissilis* and *Cariniana legalis*) and climacic stage (*Maytenus aquifolia* and *Esenbeckia leiocarpa*). Neither species or successional stages showed any pattern of multilocus outcrossing rate (\hat{t}_m), except for pioneer species which showed tendency for a higher outcrossing rate among related individuals than species of other successional stages (variation of 0.071 to 0.199). All species revealed deviation from random outcrossing patterns. *T. micrantha* and *E. leiocarpa* showed the highest values of correlation of paternity (\hat{t}_p), suggesting a high proportion of full sibs in their families. No clear pattern for the distribution of genetic diversity among and within populations of species from different successional stages was observed. The results indicated that the genetic structure of these species is associated with patterns of reproduction and demography within populations. Species with higher outcrossing rates, more aggregated distribution and higher population density showed smaller genetic divergence among populations than species with higher selfing rates and lower population density.

KEYWORDS: Mating system, Genetic structure, Tropical tree species

INTRODUÇÃO

Os estudos genéticos em populações naturais de espécies arbóreas tropicais, baseados em marcadores genéticos, iniciaram-se na Malásia (Gan et al., 1981), porém tiveram grande avanço nas florestas neotropicais do Panamá (Hamrick e Loveless, 1986), da Costa Rica (Bawa e O'Malley, 1987) e do Brasil (Herritt, 1991; Moraes, 1993; Paiva et al., 1994). Para ecossistemas de alta diversidade de espécies, tais como as florestas tropicais, onde é praticamente impossível estudar todas do ponto de vista genético, a escolha das espécies passa a ter cada vez mais importância, principalmente para interpretar a comunidade e extrapolar os resultados para espécies com características semelhantes. Os resultados de diversidade genética que vêm sendo obtidos em espécies de diferentes grupos sucessionais mostram que a sucessão, a densidade populacional e as características de reprodução podem indicar espécies-modelo para representar parte da comunidade de espécies arbóreas tropicais. A amostragem de espécies-modelo de diferentes grupos sucessionais, em ecossistemas semelhantes e utilizando os mesmos marcadores genéticos pode permitir avanços no entendimento genético das populações naturais de espécies arbóreas, bem como auxiliar na constru-

ção de indicadores para monitorar as ações na floresta tropical (manejo, restauração de áreas degradadas, corredores de fluxo gênico, tamanhos mínimos de reservas e número de matrizes para a coleta de sementes). Acredita-se que as espécies arbóreas de diferentes grupos sucessionais apresentem padrões característicos de estrutura genética. Espécies arbóreas pioneiras, devido às suas características como ciclo de vida curto (~20 anos), alta densidade populacional, ocorrência agregada e dispersão de sementes a curta distância, provavelmente apresentam fluxo gênico de curta distância, causando alta divergência genética entre populações ($q_p = 15\%$ a 25%). Espécies secundárias, por suas características de ciclo de vida longo e menor densidade populacional, possivelmente, apresentam fluxo gênico intermediário, com moderada divergência genética entre populações (5% a 15%). Finalmente, espécies climácicas, por suas características de vida longa, baixa densidade populacional e altos níveis de cruzamento, provavelmente, apresentam fluxo gênico a longa distância com baixa divergência genética entre populações ($q_p = 5\%$).

Informações de ecologia e genética em populações naturais de espécies arbóreas tropicais são incipientes na literatura, em função da alta diversidade e complexidade de espéci-

es, trazendo dificuldades na amostragem e nas metodologias apropriadas para seu estudo. Esse conhecimento é essencial para o entendimento da estrutura genética das populações e, portanto, para o delineamento de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentado (definição de tamanho de reservas, manejo adequado das espécies, recuperação de áreas degradadas, coleta de sementes para plantios com espécies nativas). Tais informações são estratégicas para a conservação da Floresta Atlântica e mesmo da Floresta Amazônica, gerando indicadores para estabelecimento e manejo de reservas genéticas *in situ*, assim como para a implantação de corredores de fluxo gênico entre pequenas reservas.

Visando avançar nos estudos genéticos populacionais de espécies arbóreas da Floresta Tropical Atlântica, objetivou-se: i) caracterizar, via marcadores genéticos, populações naturais de espécies-modelo, representativas de grupos ecológicos sucessionais, em florestas pouco perturbadas; ii) analisar o sistema de reprodução das espécies; iii) estimar parâmetros de diversidade e estrutura genética usando marcadores genéticos; iv) detectar possíveis padrões de diversidade genética nos diversos grupos sucessionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Características das espécies

Espécies pioneiras

Trema micrantha (L.) B. - A espécie ocorre entre as latitudes 30°N (Estados Unidos) e 30°S (Brasil) e é classificada no grupo sucessional como pioneira. *T. micrantha* ocorre em alta densidade de indivíduos por hectare. Suas flores são unissexuais ou andróginas, polinizadas por insetos e a dispersão das sementes ocorre por zoocoria, principalmente por aves (Carvalho, 1994).

Cecropia pachystachya Trec. - A espécie ocorre em várias formações florestais, sendo encontrada desde o Ceará até o Rio Grande do Sul e, também na Argentina e no Paraguai (Carvalho, 1994). A planta é dióica e quando adulta, comumente apresenta de 4 m a 7 m de altura e 15 cm a 25 cm de diâmetro à altura do peito (DAP). Trata-se de uma espécie pioneira, seletiva e hidrófila. É raro encontrá-la no interior da mata primária densa, sendo mais comum em matas secundárias e, também, em capoeiras novas situadas junto a vertentes ou cursos d'água, onde ocorre em alta densidade de indivíduos por hectare. Produz uma grande quantidade de sementes as quais são dispersas por aves ou mamíferos (Lorenzi, 1992).

Espécies secundárias

Cedrela fissilis Vell. - A espécie ocorre entre as latitudes 12°N (Costa Rica) a 33°S. (Brasil), em baixa densidade de indivíduos por hectare e é uma das mais ameaçadas pelo corte seletivo e destruição de sua principal área de ocorrência na Mata Atlântica no centro-sul do Brasil. Essa espécie apresenta de 10 m a 30 m de altura e 40 cm a 50 cm de diâmetro e quando adulta possui flores unissexuadas, de 7 mm a 10 mm de comprimento, reunidas em tirso axilares. É uma espécie secundária tardia e apresenta dispersão anemocórica (Carvalho, 1994).

Cariniana legalis (Mart.) O. Ktze - A espécie ocorre entre as latitudes 8°S (PE) a 23°S (SP), em altitudes de 30 a 1.000 m. *C. legalis* é uma das maiores árvores da floresta tropical úmida da América do Sul, chegando a atingir diâmetros superiores a 3 m e alturas superiores a 40 m. As flores são hermafroditas, polinizadas por abelhas e a dispersão é anemocórica. Entre as categorias sucessionais, a espécie enquadra-se no grupo de secundária tardia. Encontra-se, principalmente, no estrato superior da Floresta Estacional Semidecidual (Carvalho, 1994), comumente em pequenos grupos e em baixa densidade populacional.

Espécies climáticas

Maytenus aquifolia Mart. - *M. aquifolia* é uma espécie arbórea de estágio sucessional tardio da Floresta Tropical Atlântica. Sua distribuição é ampla, ocorrendo principalmente em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, mas também, em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, embora em menor intensidade. Seu sistema reprodutivo ainda não foi estudado, mas a dispersão das sementes é zoocórica, efetuado principalmente por aves.

Esenbeckia leiocarpa Engl. - *E. leiocarpa* é semidecídua típica, da Floresta Latifoliada Primária, caracterizada como espécie clímax, com distribuição espacial agregada (altas densidades de indivíduos por população). A espécie é alógama, com flores hermafroditas e polinização feita por pequenos insetos (moscas). A deiscência do fruto é explosiva e a dispersão atinge curta distância. Entretanto, algumas sementes podem, ocasionalmente, ser dispersas por pássaros a alguns quilômetros de distância.

Amostragem e locais de estudo

O estudo foi realizado em vários locais de ocorrência das espécies, procurando-se, na medida do possível, utilizar os mesmos fragmentos na amostragem (Tabelas 1 e 2). Para as

espécies *C. pachystachya*, *C. fissilis* e *E. leiocarpa*, foram estudadas duas gerações (árvores adultas e suas progênes de polinização livre). Em *C. legalis*, foram estudadas apenas progênes de polinização livre e, em *M. aquifolia*, somente as árvores adultas. Em *T. micrantha*, foram estudados três estágios do ciclo de vida: banco de sementes, árvores adultas e progênes de polinização livre (Tabela 2).

Análise de eletroforese de isoenzimas

As análises genéticas de *T. micrantha*, *C. pachystachya*, *C. legalis*, *M. aquifolia* e *E. leiocarpa* foram realizadas por eletroforese de isoenzimas em gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%. Foram testados vários sistemas de tampão de extração e cuba/gel, em várias isoenzimas para cada espécie. A metodologia utilizada para extração, corridas e interpretação dos zimogramas seguiu os procedimentos de Kephart (1990) e Alfenas (1998). Todos os processos foram realizados no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ / USP, Piracicaba, SP. O material amostrado constituiu de tecidos foliares de árvores adultas e suas progênes. Esta metodologia foi aplicada para todas as espécies.

Tabela 1

Características dos locais de amostragem.
(Sampling site characteristics)

Locais	Latitude S.	Longitude W.	Altitude (m)	Área (ha)
Arapoti - PR	24°15'	50°00'	700	2.000
Caetetus - SP	22°22'	49°40'	500	2.179
Campinas - SP	22°55'	47°03'	652	10
Caçador - PR	26°46'	26°46'	920	772
Ibicatu - SP	22°47'	47°49'	500	76
Morro Baú - SC	26°47'	48°55'	500	850
Morro Diabo - SP	22°31'	52°10'	560	1.547
Mato Grosso - MT	22°15'	53°60'	540	280
Prairinha - SP	22°47'	47°49'	500	150
Saibadela - SP	24°13'	48°04'	500	46.086
Santa Genebra - SP	22°49'	47°06'	500	252
Serra do Japi - SP	23°11'	46°52'	760	27.686
Vassununga - SP	21°41'	47°39'	600	191

Tabela 2

Amostragem em seis espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios de sucessão.
(Sampling in six tropical tree species from different successional stages)

Espécies	Locais (Pop)	SPop.	Progênies	Nº de adultos	Ind./prog.
<i>T. micrantha</i>	Santa Genebra	6	10	96	10
	Caetetus	5	14	82	10
<i>C. pachystachya</i>	Santa Genebra	3	11	94	10
	Caetetus	2	13	83	10
<i>C. fissilis</i>	Caetetus	---	---	30	---
	Caçador	---	---	30	---
	Morro Baú	---	---	30	---
	Morro Diabo	---	---	30	---
	Mato Grosso	---	---	30	---
	Santa Genebra	---	---	30	---
	Sete Barras	---	5	---	30
<i>C. legalis</i>	Campinas	---	16	16	20
	Ibicatu	---	17	17	20
	Vassununga	---	22	22	20
<i>M. aquifolia</i>	Santa Genebra	---	---	27	---
	Arapoti	---	---	55	---
	Serra do Japi	---	---	37	---
	Caetetus	---	---	35	---
	Saibadela	---	---	39	---
<i>E. leiocarpa</i>	Prainha	2	---	78	---
	Ibicatu	2	10	77	20
	Caetetus	2	10	79	20
	Santa Genebra	2	---	35	---

Análise de marcadores microsatélites

C. fissilis foi a única espécie submetida à técnica de marcadores microsatélites. Foram realizadas as seguintes etapas: (1) digestão total do DNA genômico com enzima de restrição de cortes frequentes; (2) recuperação em gel de agarose por meio de eletroforese, dos fragmentos de DNA compreendidos entre 200 e 800pb, utilizando a membrana DEAE-celulose NA-45; (3) ligação dos fragmentos às seqüências adaptadoras com sítios de restrição complementares à enzima utilizada na etapa inicial de digestão do DNA; (4) enriquecimento da bi-

blioteca com os clones que possuem as seqüências repetitivas, através de hibridização com oligonucleotídeos biotinilados, complementares às seqüências AG/TC e recuperação destes fragmentos através de contas magnéticas; (5) amplificação via PCR dos fragmentos recuperados e clonagem em vetor pGEM T; (6) seleção dos clones contendo a inserção de fragmentos com seqüências microsatélites através de hibridização das colônias transferidas para uma membrana de nylon, utilizando sondas com seqüências complementares ao dinucleotídeo; (7) transferência dos clones positivos para pla-

ca tipo Elisa de 96 poços para a excisão do plasmídeo; (8) extração do DNA plasmidial dos clones positivos através de *minipreps*; (9) seqüenciamento dos clones por Dye-Terminator e marcação fluorescente e resolução em seqüenciador automático ABI Prism™ 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer); (10) desenho dos *primers* utilizando o software *Primer*. Foram utilizados quatro pares de *primers* que apresentaram a melhor qualidade de resolução e segregação. O desenvolvimento dos marcadores SSR foi realizado no Laboratório de Genética de Plantas do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN / EMBRAPA) e as análises posteriores foram realizadas no LARGEA / ESALQ / USP, Piracicaba.

Marcador dominante (RAPD)

T. micrantha, *M. aquifolia* e *E. leiocarpa* tiveram suas populações analisadas, também, por marcadores dominantes do tipo RAPD. Os dados obtidos por esse processo foram usados para inferir sobre a estrutura genética das populações, pela análise de variância molecular (AMOVA Excoffier et al., 1992). Tais análises foram desenvolvidas utilizando-se o programa ARLEQUIN (Schneider et al., 2000), testando-se níveis hierárquicos com duas e quatro populações compostas por duas subpopulações cada. As análises de variância foram efetuadas para discriminar, da variância genética total, os componentes de covariância devido às diferenças em nível intra e inter indivíduos e/ou entre subpopulações, dentro de populações (Weir, 1996).

Análise estatística

O sistema de reprodução das populações foi analisado com base nos modelos de cruzamento misto de Ritland e Jain (1981) e de cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989), com o auxílio dos programas "Multiloco MLTR" de Ritland (1994) para os dados de marcadores codominantes. Os parâmetros estimados foram:

1) taxa populacional de cruzamento multiloco (\hat{f}_m), utilizando o método "Expectation-Maximization"; 2) taxa de cruzamento populacional média uniloco (\hat{f}_s); 3) taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($\hat{f}_m - \hat{f}_s$); 4) correlação de autofecundação (\hat{f}_i), e 5) correlação de paternidade (\hat{f}_p). O modelo de cruzamento misto pressupõe que as progênes resultem de uma mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundação (Ritland e Jain, 1981). O erro padrão das estimativas dos parâmetros foi obtido por 1.000 reamostragens bootstraps, usando-se as progênes como unidades de amostragem. Os parâmetros do sistema de reprodução só não foram estimados para *M. aquifolia*, devido à baixa frutificação das árvores e baixa germinação das sementes.

A estrutura genética das populações foi quantificada mediante análise da variância de frequências gênicas (Weir, 1996), a qual fornece a distribuição da diversidade genética nos vários níveis hierárquicos em que a amostragem foi estruturada. Foram utilizados diversos modelos estatístico-genéticos para as análises da variância, de acordo com a hierarquia da amostragem de cada espécie. Os parâmetros estimados foram: \hat{q}_p = divergência genética entre populações; \hat{q}_{sp} = divergência genética entre subpopulações / população; \hat{q}_F = coeficiente de coancestralidade entre plantas dentro de progênes; \hat{F} = índice de fixação para o conjunto das populações; \hat{f} = índice de fixação para a média das populações. Para verificar se as estimativas médias de \hat{q}_p , \hat{q}_{sp} , \hat{q}_F , \hat{F} , e \hat{f} eram diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança com 95% de probabilidade, pelo método de reamostragem bootstrap, utilizando-se 10.000 repetições sobre locos. As análises de variâncias e os bootstraps foram efetuados com o programa GDA de Lewis e Zaykin (1999).

O fluxo gênico (\hat{Nm}) entre as subpopulações e populações foi estimado de forma indireta, assumindo o modelo de ilhas proposto por Crow e Aoki (1984), o qual corrige a análise para pequeno número de populações, aplicando-se a expressão:

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

em que, $\hat{N}m$ corresponde ao número de migrantes por geração e \hat{q} corresponde a \hat{q}_{sp} e \hat{q}_p , de acordo com o nível de análise e α é a correção para o número de populações (n), $\alpha = (n/n-1)^2$.

A diversidade genética intrapopulacional foi estimada pela heterozigosidade observada (\hat{H}_o), diversidade gênica esperada segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e), número médio de alelos por loco (\hat{A}), porcentagem de locos polimórficos ($\hat{p}_{95\%}$) e índice de fixação de Wright (\hat{F}), usando-se o programa BIOSYS-1 (Swofford e Selander, 1989). A heterozigosidade observada (\hat{H}_o), para cada loco, foi calculada por $\hat{H}_o = 1 - \sum p_{ii}$, sendo: P_{ii} = frequência dos genótipos homozigotos. A diversidade gênica esperada (\hat{H}_e) para cada loco foi estimada segundo Nei (1977) por: $\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$, em que: p_i = frequência alélica estimada do i -ésimo alelo. A estimativa média de \hat{H}_o e \hat{H}_e sobre os locos foi obtida pela média aritmética entre todos os locos analisados (monomórficos e polimórficos). A porcentagem de locos polimórficos ($\hat{p}_{95\%}$) foi estimada pela média aritmética do número de locos polimórficos dividido pelo número total de locos, considerando-se o loco polimórfico

quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassava 95%. O número médio de alelos por locos (\hat{A}) foi calculado pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. O índice de fixação não viesado (\hat{F}) foi estimado de acordo com Weir (1996), por,

$$\hat{f} = \frac{(\hat{H}_e - \hat{H}_o) + \frac{1}{2n} \hat{H}_o}{\hat{H}_e - \frac{1}{2n} \hat{H}_o}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sistema de reprodução

Todas as espécies apresentaram taxas altas de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m \geq 0,8$), mostrando que estas são alógamas ou de sistema misto de reprodução com predominância da alogamia (Tabela 3). A espécie pioneira *T. micrantha* foi a que apresentou a menor taxa de cruzamento (0,819, população Santa Genebra). Todavia, esta taxa ainda pode ser considerada alta. As altas taxas de cruzamento observadas estão de acordo com os resultados relatados na maioria dos trabalhos com espécies arbóreas, tanto tropicais quanto temperadas. Quase todos os estudos têm mostrado a predominância da alogamia ou sistemas mistos, com altas taxas de cruzamentos.

Tabela 3

Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em cinco espécies arbóreas tropicais de diferentes estados sucessionais.

(Estimative of parameters of the mating system in five tropical tree of different successional state)

Espécies	Pop.	\hat{t}_m	\hat{t}_s	$\hat{t}_m - \hat{t}_s$	\hat{r}_s	\hat{r}_p
<i>T. micrantha</i>	Sta. Genebra	0,819 (0,079)	0,749 (0,059)	0,071 (0,036)	0,368 (0,177)	0,606 (0,119)
	Caetetus	0,966 (0,019)	0,844 (0,035)	0,123 (0,025)	0,072 (0,013)	0,602 (0,087)
<i>C. pachystachya</i>	Sta. Genebra	1,000 (0,0)	0,820 (0,103)	0,180 (0,064)	0,0 (0,0)	0,159 (0,032)
	Caetetus	1,000 (0,0)	0,801 (0,810)	0,199 (0,028)	0,0 (0,0)	0,514 (0,083)
<i>C. fissilis</i> ^a	Sete Barras	0,882 (0,056)	0,691 (0,051)	0,191 (0,048)	0,149 (0,026)	0,125 (0,033)
<i>C. legalis</i>	Campinas	0,990 (0,009)	0,899 (0,016)	0,091 (0,012)	0,101 (0,005)	0,324 (0,045)
	Ibicatu	0,976 (0,011)	0,916 (0,014)	0,059 (0,011)	0,093 (0,008)	0,295 (0,045)
	Vassununga	0,901 (0,025)	0,830 (0,032)	0,070 (0,025)	0,076 (0,009)	0,212 (0,033)
<i>E. leiocarpa</i> ^a	Prainha	0,925 (0,081)	0,859 (0,065)	0,051 (0,032)	0,099 (0,033)	0,986 (0,037)
	Ibicatu	0,997 (0,017)	0,937 (0,020)	0,061 (0,018)	0,104 (0,004)	0,749 (0,080)

(): Desvio padrão da média; ^a: Seoane et al. (2001).

\hat{t}_m = taxa de cruzamento uniloco; \hat{t}_s = taxa de cruzamento multiloco; $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ = taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados; \hat{r}_s = correlação de autofecundação; \hat{r}_p = correlação de paternidade.

Em todas as espécies e suas populações, foram detectados cruzamentos entre indivíduos aparentados, sugerindo a existência de estruturas de famílias dentro das populações. Esta hipótese parece plausível, considerando as características demográficas de algumas espécies. *T. micrantha*, *C. pachystachya*, *C. legalis* e *E. leiocarpa* costumam apresentar distribuição espacial intrapopulacional agregada, com tamanhos variando de três a centenas de indivíduos, constituindo, possivelmente, demes panmíticos. O agrupamento é formado pelas características de dispersão das espécies, onde grandes quantidades de sementes são depositadas nas vizinhanças das árvores matrizes. Esta característica dispersiva aumenta a probabilidade do estabelecimento de filhos próximos à árvore matriz e cruzamentos entre indivíduos aparentados, como os detectados neste estudo.

A correlação de autofecundação (\hat{r}_i) foi baixa nas populações estudadas, com exceção da população de *T. micrantha* em Santa Genebra (0,368), sugerindo que a taxa de cruzamento não varia muito entre árvores. Por outro lado, na população Santa Genebra, alguns indivíduos de *T. micrantha* exibiram a tendência de produzir mais indivíduos por autofecundações do que outros, o que sugere um possível controle genético para o fenômeno. Uma explicação pode ser que tais plantas não possuam carga genética (genes letais e/ou semiletais), permitindo a geração de sementes por autofecundação. Já, em indivíduos que possuem carga genética, embriões originados por autofecundação seriam, em parte, eliminados antes da formação de sementes e somente as de cruzamento seriam geradas.

A correlação de paternidade (\hat{r}_p) revelou a ocorrência de cruzamentos biparentais nas populações, indicando, juntamente com a taxa de autofecundação ($1-\hat{r}_m$), que as progênes não são constituídas, exclusivamente, por meios-

irmãos, mas sim por uma combinação de meios-irmãos, irmãos-completos e irmãos de autofecundação. No caso de *T. micrantha* e de *E. leiocarpa*, a magnitude de \hat{r}_p ($>0,6$) mostrou que as progênes são, na maioria, irmãos completos, contrastando com a teoria geral de que, em populações naturais, existe o predomínio de cruzamentos aleatórios. Estas altas estimativas são comuns nas espécies com distribuição espacial agregada que dependem da ação de insetos polinizadores. A combinação de grandes vizinhanças e comportamento forrageiro dos polinizadores, visitando árvores próximas e de forma sistemática, poderia explicar as altas proporções de irmãos-completos nas progênes destas espécies. No entanto, são necessários estudos complementares sobre a biologia reprodutiva das espécies e do comportamento forrageiro dos polinizadores, a fim de se entender melhor a ocorrência dos cruzamentos biparentais.

Todas as espécies avaliadas mostraram a ausência de aleatoriedade nos cruzamentos. Desvios de cruzamentos aleatórios implicam na necessidade da adoção de maiores tamanhos amostrais do que os adotados até este momento, para a retenção de tamanhos efetivos adequados para a conservação *ex situ*. No melhoramento genético, os desvios implicam na necessidade da incorporação de modelos biométricos que considerem os desvios dos cruzamentos aleatórios como, por exemplo, os desenvolvidos por Cockerham e Weir (1984) e Ritland (1989).

A comparação entre espécies de diferentes estágios sucessionais mostrou que as pioneiras tendem a apresentar maiores taxas de cruzamentos entre parentes. Esta característica está, provavelmente, associada à sua distribuição agregada, grande tamanho populacional e ao ciclo de vida mais curto do que as espécies de outros estágios de sucessão. Uma dinâmica

rápida de colonização, crescimento e extinção pode aumentar o parentesco intrapopulacional, pela intensificação da sobreposição de gerações. Como visto pela correlação de paternidade, a relação de parentesco das sementes encontra-se entre aquela de meios-irmãos e de irmãos de autofecundação.

Diversidade genética entre e dentro de populações

As estimativas do índice de fixação médio dentro de populações (\hat{f}), total das populações (\hat{F}), coeficiente de coancestralidade dentro de progênies (\hat{q}_r), divergência genética entre subpopulações (\hat{q}_{sp}), entre populações (\hat{q}_p) e o fluxo gênico entre subpopulações ($\hat{N}_{m,sp}$) e entre populações ($\hat{N}_{m,p}$) encontram-se na Tabela 4. A distribuição da variabilidade genética dentro de populações, entre subpopulações e entre populações para os dados de RAPD encontram-se na Tabela 5.

A análise da divergência genética entre populações (\hat{q}_p) mostrou, em todas as espécies, tanto para os dados de isoenzimas quanto para RAPD, que a maior parte da diversidade genética (>85%) encontra-se distribuída dentro das populações (Tabelas 4 e 5). Este padrão de distribuição está de acordo com o observado para outras espécies arbóreas e com o esperado em espécies alógamas ou de sistema misto, predominantemente alógamas, com eficiente mecanismos de dispersão de pólen e sementes (fluxo gênico). As habilidades dos indivíduos em trocar genes, associadas ao fluxo gênico entre populações, reduzem as diferenças entre populações por deriva genética e seleção, reduzindo a diversidade genética entre populações. Como estas espécies são alógamas ou de sistema misto de reprodução, o padrão de distribuição observado está de acordo com o esperado. *C. fissilis* e *M. aquifolia* apresentaram valores relativamente altos de divergência genéti-

ca entre populações (8,2% e 14,7%, respectivamente), o que, possivelmente, está associado à amplitude da amostragem realizada, visto que, nessas espécies foi amostrado um maior número de populações. A magnitude da divergência genética observada em *M. aquifolia* (0,147) foi superior à esperada em progênies de meios-irmãos (0,125), dando a entender que suas populações são constituídas por indivíduos com graus de parentescos superiores aos de meios-irmãos. Isto significa que existe uma alta relação de parentesco dentro das populações de *M. aquifolia*, levando-as a se comportarem como misturas de progênies de meios-irmãos e de irmãos-completos. A causa deste alto grau de parentesco pode ser a vida longa dessa espécie, levando à sobreposição de gerações, à deriva genética e ao isolamento parcial das populações, fazendo com que estas se comportem como progênies, e à dispersão de altas proporções de progênies de irmãos-completos ou de irmãos de autofecundação próximas à árvore matriz.

A divergência genética entre as subpopulações (\hat{q}_{sp}) foi baixa para *T. micrantha*, *C. pachystachya* e *E. leiocarpa*, mas, relativamente alta para *M. aquifolia* (18,6%), quando analisada via RAPD. A alta divergência genética observada entre subpopulações em *M. aquifolia* confirma que a relação de parentesco dentro das populações é alta, estando entre a observada em meios-irmãos e em irmãos-completos. Os valores estimados da divergência genética entre subpopulações (\hat{q}_{sp}) para *M. aquifolia* e *E. leiocarpa* foram maiores do que os observados entre populações (\hat{q}_p), dando a entender que a manutenção de subpopulações destas espécies é uma estratégia importante para se preservar sua diversidade genética natural. Resultados semelhantes foram relatados em *E. leiocarpa* por Seoane et al. (2000).

Tabela 4

Distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, em seis espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais.

(Distribution of genetic diversity among and within populations, in six tropical tree species of different successional stage)

Espécies	Ger.	nl	\hat{f}	\hat{F}	\hat{q}_F	\hat{q}_{SP}	$\hat{N}m_{SP}$	\hat{q}_P	$\hat{N}m_P$
<i>T. micrantha</i>	Adul.	8	-0,090	-0,016	---	0,068	2,3	-0,007	1,0
	Prog.	13	-0,150	0,133	0,247 **	---	---	0,022	2,8
<i>C. pachystachya</i>	Adul.	7	-0,006	0,080	---	0,086	1,0	0,026	2,3
	Prog.	7	-0,111*	0,150*	0,235 *	---	---	0,018	3,4
<i>C. fissilis</i> ^a	Adul.	4	0,178**	0,246**	---	---	---	0,082**	1,9
<i>C. legalis</i>	Prog.	14	0,119*	0,249*	0,139 *	---	---	0,009	12,2
	Prog.	---	---	---	0,025 ^b	---	---	0,047 ^b	---
<i>M. aquifolia</i>	Adul.	9	0,395*	0,484**	---	---	---	0,147	0,9
<i>E. leiocarpa</i>	Adul.	8	0,009	0,058	---	---	---	0,049*	1,2

^a: Microsatélites; ^b: caracteres quantitativos; nl: Número de locos.

As estimativas do fluxo gênico aparente entre subpopulações ($\hat{N}m_{SP}$) e entre populações ($\hat{N}m_P$) foram, em geral altas (>1), com exceção de *M. aquifolia* (0,9) (Tabela 4). Tratando-se de genes neutros, quando o valor de $\hat{N}m$ é próximo ou superior à unidade, espera-se baixa diferenciação entre populações por deriva ou seleção (Wright, 1931). Entretanto, considerando se tratar de espécies arbóreas de ciclo de vida longo e isoladas em fragmentos, acredita-se que o fluxo estimado reflita um acontecimento passado, quando as populações eram interligadas por florestas praticamente contínuas. Assim, caso estas populações mantenham-se isoladas, espera-se que, no futuro, ocorra aumento nos níveis de diferenciação genética entre populações, por deriva genética.

As estimativas da coancestralidade dentro de progênies ou da divergência genética entre progênies (\hat{q}_F) foram superiores ao esperado em progênies de meios-irmãos para as três espécies estudadas (*T. micrantha*, *C. pachystachya* e *C. legalis*). A magnitude de \hat{q}_F estimada para *T. micrantha* e *C. pachystachya* foi próxima à esperada em progênies de irmãos-completos (0,25), confirmando o que já havia sido observado pela correlação de paternidade (\hat{r}_P), na análise do sistema da reprodução.

O índice de fixação para o total das populações (\hat{F}) foi positivo, alto e significativamente diferente de zero, na maioria das espécies, com

exceção das plantas adultas de *T. micrantha* que apresentaram valor negativo, baixo e não significativo. Valores altos e significativos para o índice \hat{F} significam que o conjunto das populações desvia-se da pressuposição de cruzamentos aleatórios, estando as populações estruturadas devido à deriva genética. As espécies pioneiras e *E. leiocarpa* tenderam a conter menos endogamia, comparativamente às espécies secundárias e à climáxica *M. aquifolia*. Uma explicação para isso pode estar associada ao fato de que *E. leiocarpa* é auto-incompatível (Crestana et al., 1982), *C. pachystachya* é dióica e *T. micrantha* provavelmente sofre forte seleção contra homozigotos. A comparação entre plantas adultas e as progênies de *T. micrantha* e *C. pachystachya* mostrou que o índice \hat{F} foi maior nas progênies do que nos adultos, sugerindo seleção contra homozigotos e a presença de depressão por endogamia nestas espécies. Tendência semelhante tem sido observada em outras espécies arbóreas tropicais (Murawski, 1995; Sebbenn et al., 2000).

De modo geral, não se observou um padrão de distribuição da variabilidade genética ou índices de fixação que diferenciem as espécies entre classes sucessionais. Os padrões observados parecem estar mais associados às características demográficas e reprodutivas do que ao estágio sucessional.

Tabela 5

Distribuição da variabilidade genética dentro de populações, entre subpopulações e entre populações, em três espécies arbóreas tropicais de diferentes estados sucessionais, a partir de marcadores RAPD.

(Distribution of genetic variability within populations, among subpopulation and among populations, in thee tropical tree species of different successional stage, using RAPD markers)

Espécies	N° marcas	Pop/SPop.	Dentro de pop.	Entre subpop.	Entre pop.
<i>T. micrantha</i>	34	2 (2)	92,2%	3,0%	4,8%
<i>M. aquifolia</i>	17	2(2)	81,1%	18,6%	0,2%
<i>E. leiocarpa</i>	24	4(2)	97,7%	7,7%	2,3%

() Número de subpopulações.

Diversidade genética intrapopulacional

Os índices de diversidade porcentagem de locos polimórficos ($\hat{p}_{95\%}$), número médio de alelos por locos (\hat{A}), heterozigosidade média observada (\hat{H}_o) e, heterozigosidade média esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e) não podem ser comparáveis entre estimativas obtidas via marcadores isoenzimáticos e microssatélites (Tabela 6), devido ao poder da técnica de microssatélites, em detectar diferentes alelos nos locos, ser muito superior ao das isoenzimas. Isto pode ser observado, avaliando-se o número médio de alelos por locos (\hat{A}) e os níveis de heterozigosidade em *C. fissilis*, relativamente às outras espécies. O número médio de alelos por locos (mínimo 5,2) e a heterozigosidade observada (mínimo 0,564) em *C. fissilis* foram superiores aos estimados para as espécies avaliadas por isoenzimas (máximo: $\hat{A} = 3,4$; $\hat{H}_e = 0,480$).

Para os dados de RAPD, não foram estimados os índices de diversidade porque seria necessário pressupor que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Logo, seria necessário assumir o índice de fixação igual a zero. O EHW pressupõe que os cruzamentos ocorrem aleatoriamente, portanto, não havendo endogamia, seleção, migração ou mutação. A análise do sistema de reprodução (Tabela 3) mostrou que todas as espécies violaram a suposição de cruzamentos aleatórios e o índice de fixação (Tabela 6) indicou a presença de endogamia na maioria das espécies. O índice de fixação é um dos parâmetros mais importantes em genética de populações, por medir o balanço entre homocigotos e heterocigotos nas populações. Pode-se concluir, com isso,

que os marcadores isoenzimáticos são menos informativos do que os microssatélites, porém, são mais informativos e adequados do que marcadores RAPD para estudar a diversidade genética entre e dentro de populações.

A porcentagem de locos polimórficos ($\hat{p}_{95\%}$) foi baixa nas populações de *M. aquifolia* e *E. leiocarpa*, mostrando que, em muitos locos, existem alelos fixados. Por outro lado, *M. aquifolia* foi a espécie analisada por isoenzimas que revelou o maior número médio de alelos por loco (variação de 2,5 a 3,4), o que expressa seu grande potencial para gerar novas combinações genotípicas e ampliar a base genética das populações. *C. legalis*, também, apresentou número relativamente alto de alelos nos locos (2,7 a 3,0). Por sua vez, as espécies pioneiras *T. micrantha*, *C. pachystachya* e a climática *E. leiocarpa* apresentaram o menor número de alelos por loco. Este resultado é intrigante porque espécies de grande tamanho e densidade populacional (*T. micrantha*, *C. pachystachya* e *E. leiocarpa*), teoricamente, teriam que apresentar maior número de alelos, pela maior probabilidade de aparecer novos alelos via mutação. Por outro lado, em espécies de baixa densidade populacional, seria esperado menor número de alelos pelos mesmos motivos. Porém, os resultados deste estudo mostraram o oposto e a explicação não é simples. Pode-se supor que as espécies que hoje são raras eram abundantes no passado. Outra explicação seria que, como estas espécies são raras, elas teriam algum mecanismo evolutivo que favorecesse a criação de novos alelos, como uma estratégia para manter a diversidade genética, o que é pouco provável.

Tabela 6

Índices de diversidade genética dentro de populações em seis espécies arbóreas tropicais de diferentes estados sucessionais.

(Indexes of genetic diversity within population in six tropical tree species of different successional stage)

Espécies	População	$\hat{P}_{95\%}$	\hat{A}	\hat{H}_o	\hat{H}_e	\hat{F}
<i>T. micrantha</i>	Santa Genebra	100 %	2,2	0,446	0,373	-0,204 (0,136)
	Banco de solo	100 %	2,1	0,406	0,378	0,028 (0,035)
	Caetetus	100 %	2,2	0,366	0,392	0,066 (0,047)
<i>C. pachystachya</i>	S. Genebra	100 %	2,2	0,373	0,355	-0,052 (0,221)
	Caetetus	100 %	2,3	0,319	0,335	0,049 (0,161)
<i>C. fissilis</i> ^a	Caetetus	100 %	13,0	0,818	0,866	0,056 (0,063)
	Caçador	100 %	14,2	0,742	0,907	0,185 (0,065)
	Morro Baú	100 %	13,7	0,732	0,880	0,170 (0,112)
	Morro Diabo	100 %	14,5	0,731	0,887	0,178 (0,168)
	Mato Grosso	100 %	5,2	0,564	0,624	0,099 (0,184)
	Santa Genebra	100 %	10,5	0,614	0,856	0,289 (0,152)
<i>C. legalis</i>	Campinas	100 %	2,7	0,263	0,348	0,249 (0,089)
	Ibicutu	100 %	2,8	0,267	0,350	0,242 (0,054)
	Vassununga	100 %	3,0	0,287	0,366	0,220 (0,120)
<i>M. aquifolia</i>	Saibadela	70 %	3,4	0,271	0,480	0,358 (0,104)
	Santa Genebra	60 %	3,0	0,228	0,369	0,296 (0,313)
	Arapoti	50 %	3,4	0,154	0,295	0,479 (0,094)
	Serra do Japi	70 %	2,7	0,219	0,370	0,325 (0,156)
	Caetetus	40 %	2,5	0,132	0,255	0,487 (0,399)
<i>E. leiocarpa</i>	Prainha	75 %	2,2	0,363	0,338	0,068 (0,141)
	Ibicatu	75 %	2,4	0,427	0,444	-0,039 (0,189)

^a: Microsatélites.

\hat{A} = número médio de alelos por locos.

\hat{H}_e = heterozigosidade média esperada.

$\hat{P}_{95\%}$ = porcentagem de locos polimórficos.

\hat{H}_o = heterozigosidade média observada.

\hat{F} = índice de fixação.

As heterozigosidades observadas (\hat{H}_o) e a esperadas (\hat{H}_e) foram altas (mínimo 0,132) nas espécies, com valores, muitas vezes, maiores aos relatados por Hamrick e Godt (1990) para a média das espécies arbóreas tropicais (0,109), mostrando parte do potencial genético das espécies para conservação *in situ*. Comparando as espécies em termos de \hat{H}_o , *T. micrantha* e *E. leiocarpa* apresentaram os maiores valores e a *M. aquifolia* os menores. Em termos de \hat{H}_e , as diferenças entre as espécies foi menor, porém, *M. aquifolia* continuou sendo a espécie com menores valores. Como já havia sido observado pelo índice $\hat{P}_{95\%}$, esta espécie contém o maior número de locos em homozigose e menor em heterozigose, entre as espécies envolvidas neste estudo. A explicação para isso deve estar

associada ao sistema de reprodução e/ou a deriva genética. Se a espécie for de reprodução mista, com predomínio de autogamia, espera-se baixo polimorfismo e maior coeficiente de endogamia, relativamente às espécies de reprodução cruzada. Outra causa pode ser o efeito fundador, em que as populações teriam sido originadas a partir de poucos indivíduos, perdendo diversidade por deriva genética.

Não foi possível determinar o sistema de reprodução de *M. aquifolia* mas, pode-se afirmar que a deriva genética contribuiu para a endogamia nas populações. A divergência genética entre populações de *M. aquifolia* foi de 14,7% (Tabela 4), sugerindo que a coancestria dentro das populações é superior à esperada entre meios-irmãos (0,125). O efeito Wahlund

parece ser a melhor explicação para o observado, segundo o qual, o aumento da taxa de homozigose seria causado pela subdivisão da diversidade genética total da espécie em populações. A subdivisão e o fluxo gênico restrito entre populações aumenta a divergência genética entre populações, restringindo os cruzamentos aos indivíduos nas populações, aumentando a endogamia, em pequenas populações para níveis superiores aos esperados em populações em EHW.

Apesar dos índices $\hat{P}_{95\%}$, \hat{A} , \hat{H}_o e \hat{H}_e não serem comparáveis entre dados de microssatélites e isoenzimas, o índice de fixação (\hat{F}) é, visto que este mede a taxa de fixação de alelos a partir de uma razão entre duas proporções: a heterozigosidade observada e a esperada. As espécies pioneiras *T. micrantha* e *C. pachystachya* e a climática *E. leiocarpa* apresentaram os mais baixos níveis de endogamia e excesso de heterozigotos. As demais apresentaram grande proporção de homozigotos, em especial *M. aquifolia*. Com exceção de *M. aquifolia*, as demais espécies mostraram ser alógamas ou de reprodução mista predominantemente alógamas. Também foram detectados alguns níveis de cruzamentos entre indivíduos aparentados. O sistema misto, combinado com os cruzamentos entre indivíduos aparentados pode aumentar, expressivamente, os níveis de endogamia das populações dessas espécies. Esta pode ser parte da causa da endogamia detectada. Contudo, *T. micrantha*, *C. pachystachya* e *E. leiocarpa* apresentaram características favoráveis à manutenção de populações com altos níveis de diversidade genética. Estas espécies, em condições naturais, ocorrem agregadas ou em forma de subpopulações com alta densidade, constituídas, muitas vezes, de centenas de indivíduos. Muitas vezes, estas espécies dominam a paisagem nos seus locais de ocorrência. Outra característica é que *C. pachystachya* é dióica e *E.*

leiocarpa apresenta mecanismos de auto-incompatibilidade (Crestana et al., 1982), o que as obriga à reprodução por cruzamentos, e a geração de endogamia somente pode ocorrer por cruzamento entre indivíduos aparentados. Por sua vez, *C. legalis* costuma ocorrer em agregados, mas constituídos por grupos pequenos de três a cinco indivíduos. Frequentemente, são observados indivíduos de *C. legalis* isolados e a espécie é considerada rara (< 1 indivíduo por hectare). *C. fissilis* e *M. aquifolia*, também, são espécies raras e costumam ocorrer isoladas. *C. legalis* e *C. fissilis* são de reprodução mista (Tabela 3) e, possivelmente, *M. aquifolia* também. Esta forma de reprodução, combinada com a característica de distribuição espacial rara, possivelmente, constitui a causa dos maiores níveis de endogamia detectados. A grande distância entre as árvores poderia favorecer as autofecundações, levando ao estabelecimento de indivíduos endógamos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de populações naturais de espécies arbóreas são caros, trabalhosos e, muitas vezes, requerem pessoal especializado para as coletas de material (sementes, folhas, propágulos). Estes fatores dificultam a inclusão de um grande número de indivíduos, populações e espécies nas análises. Seis espécies para representar a diversidade, o sistema de reprodução e a estrutura populacional de espécies de diferentes estágios de sucessão é um número restrito. Porém, serviu como uma primeira aproximação na determinação de padrões. Por exemplo, a taxa de cruzamento multiloco não apresentou nenhum padrão específico entre os estágios sucessionais. Somente foi observado que as espécies pioneiras tendem a apresentar taxas mais altas de cruzamentos entre indivíduos aparentados, comparativamente às espécies de outras categorias sucessionais. Todas as

espécies em que o sistema de reprodução foi avaliado revelaram fortes desvios de cruzamentos aleatórios, sendo que as progênies de *T. micrantha* e de *E. leiocarpa* (espécies de alta densidade média populacional) apresentaram alta correlação de paternidade, sugerindo que a relação de parentesco entre plantas dentro de progênies é de irmãos-completos. Tampouco foram observados padrões claros na distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações nas espécies dos diferentes estágios sucessionais. Os padrões observados da estrutura genética, aparentemente, estavam associados aos padrões reprodutivos e demográficos. Espécies com maiores taxas de cruzamento, distribuição agregada e alta densidade populacional apresentaram menor divergência entre populações do que as com maiores taxas de autofecundação e baixa densidade populacional. A inclusão de um número maior de espécies e populações nas avaliações poderá, no futuro, possibilitar a detecção de padrões mais claros, caso eles realmente existam, como hipotetizado no presente trabalho.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

PAULO YOSHIO KAGEYAMA é Professor Adjunto do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ / USP - Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: kageyama@esalq.usp.br

ALEXANDRE MAGNO SEBBENN é Pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo - Estação Experimental de Tupi - Caixa Postal 339 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: amsebbenn@bol.com.br

LUCIANO ARRUDA RIBAS é Doutorando junto ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ / USP - Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: laribas@esalq.usp.br

FLÁVIO BERTIN GANDARA é Professor Assistente do Departamento de Ciências Biológicas

da ESALQ / USP - Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: fgandara@esalq.usp.br
MILENE CASTELLEN é Doutoranda junto ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ / USP - Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: mscastel@esalq.usp.br

MARIA BEATRIZ PERECIM é Pesquisadora do IAC - Instituto Agrônomo de Campinas - Caixa Postal 28 - Campinas, SP - 13020-902 - E-mail: ROLAND VENCovsky é Professor Aposentado do Departamento de Genética da ESALQ / USP - Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: rvencovs@esalq.usp.br

Os autores agradecem à técnica de laboratório Elza Martins Ferraz pelo auxílio nas eletroforeses e ao técnico em agropecuária Gelson Dias Fernandes pelo auxílio nos trabalhos de campo. Também agradecem à FAPESP pelo financiamento do projeto (nº: 1998/2448-7).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- BAWA, K.S.; O'MALLEY, D.M. Estudios genéticos y de sistemas de cruzamiento en algunas espécies arbóreas de bosques tropicales. **Revista de biologia tropical**, v.35, n.1, p.177-188, 1987.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA / CNPF, 1994. 640p.
- COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Covariances of relatives stemming a population undergoing mixed self and random mating. **Biometrics**, v.40, p.157-164, 1984.
- CRESTANA, C.S.M.; DIAS, I.S.; KAGEYAMA, P.Y. Biologia floral do guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.). **Silvicultura**, v.8, n.28, p.35-38, 1982.
- CROW, J.F.; AOKI, K. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.81, p.6073-6077, 1984.

- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.
- GAN, Y.; ROBERTSON, F.W.; SOEPADMO, E. Isozyme variation in some rain forest trees. **Biotropica**, v.13, p.20-28, 1981.
- 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: Sinauer, 1990. p.43-63.
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v.18, n.3, p.201-207, 1986.
- HERRITT, M.M. **Ecology and genetic variation of four hardwoods of Brazil's Atlantic Forest Region**. Raleigh, 1991. 204p. Tese (Doutoramento). North Caroline State University
- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American journal of botany**, v.77, n.5, p.693-712, 1990.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: versão 1.0 para Windows 3.1**. s.l.p., 1999. (não publicado).
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 302p.
- MORAES, M.L.T. **Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler**. Piracicaba, 1993. 139 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo
- MURAWSKI, D.A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from a canopy perspective. In: LOWMAN, M.D.; NADKARNI, N.M. **Forest canopies**. New York: Academic Press, 1995. p.457-493
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of human genetics**, v.41, p.225-233, 1977.
- PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R.; CONTEL, P.B. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müll. Arg.): 1- genetic variation in natural populations. **Silvae genetica**, v.43, n.5/6, p.307-312, 1994.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v.43, n.4, p.848-859, 1989.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. New York, 1994. 6p. (não publicado)
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using *n* independent loci. **Heredity**, v.47, n.1, p.35-52, 1981.
- 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.; 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 o melhoramento genético. **Scientia forestalis**, n.58, p.25-40, 2000.
- SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Scientia forestalis**, n.57, p.123-139, 2000.
- SEOANE, C.E.C; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, v.13, n.1, p.19-26, 2001.
- SWOFFORD, D.L; SELANDER, R.B. **Biosys-1: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics, release 1,7**. Chicago: Illinois Natural History Survey, 1989.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: 2- methods for discrete population genetic data**. Sunderland: North Carolina State University / Sinauer Associates, 1996. 445p.
- WRIGHT, J.W. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.