

**CASSIA ALZIRA MENDES DE OLIVEIRA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE PAU-BRASIL**  
*(Caesalpinia echinata Lam.)* NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO  
**TAPACURÁ-PE**

**RECIFE**

**PERNAMBUCO – BRASIL**

**FEVEREIRO 2005**

CASSIA ALZIRA MENDES DE OLIVEIRA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE PAU-BRASIL  
(*Caesalpinia echinata* Lam.) NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO TAPACURÁ-PE

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Florestais, Área de Concentração  
Silvicultura.

Orientador:

Prof<sup>o</sup> Dr. SILMAR GONZAGA MOLICA

Colaboradores:

Prof<sup>o</sup> Dr. EDSON FERREIRA DA SILVA

Prof<sup>o</sup> Dr. RINALDO LUIZ C. FERREIRA

RECIFE

PERNAMBUCO – BRASIL

FEVEREIRO 2005

Ficha Catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

O48d Oliveira, Cassia Alzira Mendes  
Diversidade genética em populações de pau-brasil  
(*Caesalpinia echinata* Lam.) na Estação Ecológica do  
Tapacurá-PE.  
– Cassia Alzira Mendes de Oliveira – 2005.  
44f.: il.

Orientador: Silmar Gonzaga Molica  
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Depar-  
tamento de Ciência Florestal.

Referência.

CDD 581.15

1. Diversidade genética
  2. *Caesalpinia echinata*
  3. Isoenzimas
  4. Marcadores isoenzimáticos
  5. Genética de populações
  6. Pau-brasil
- I. Molica, Silmar Gonzaga  
II. Título

*A meus pais e irmãos, que me apoiaram e  
incentivaram todos os dias.*



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me capacitado a todas as coisas, principalmente para concluir este trabalho;

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Curso de Pós-graduação em Ciências Florestais da UFRPE e a Comissão de Apoio à Pesquisa e Ensino Superior (CAPES), pelo oportunidade oferecida para a realização de Pós-graduação;

Ao Prof. Dr. Silmar Gonzaga Molica, pela orientação, amizade, ensinamentos e compreensão durante o curso, sempre me incentivando a prosseguir;

Ao Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva, pela orientação em trabalhos de laboratório, pela oportunidade para trabalho conjunto e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira, pelo apoio, conselhos e conversas de incentivos;

A Bióloga Dra. Ana Cláudia Badan, pelo incentivo, convivência e amizade nos momentos mais difíceis;

A Prof. Dra. Luiza Suely, pelos ensinamentos;

Ao Dr. Visêlto Ribeiro de Oliveira, pelo apoio constante e pela orientação na análise de dados;

A Karin Von Schmalz – Peixoto, pelas sugestões como examinadora e pela transcrição do resumo para inglês;

Ao Israel e Paulo, da Estação Ecológica do Tapacurá, por permitir o acesso aos fragmentos e auxiliar na coleta de material;

Aos amigos, Ageu Júnior, Deyve André e Mallon Sampaio, pela ajuda na coleta de campo e em atividades de laboratório;

A Empresa CornProducts do Brasil (unidade de Pernambuco), pela cessão de amido de milho (penetrose) utilizado na preparação dos géis para eletroforese.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – Diversidade genética em fitopopulações	3
2.2 – Uso de marcadores bioquímicos no estudo de diversidade genética	5
3 – MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 – Local de estudo	8
3.2 – Coleta, transporte e armazenamento das amostras de folhas	8
3.3 – Extração das enzimas	9
3.4 – Procedimentos eletroforéticos	12
3.5 – Protocolo de análises	15
3.6 – Leitura e interpretação dos zimogramas	17
3.7 – Metodologia Estatística	18
3.7.1 – Estrutura genética F de Wright	18
3.7.2 – Distâncias/identidades genéticas	19
3.7.3 – Divergência genética	19
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. – Sistemas enzimáticos testados	21
4.2. - Frequências alélicas e genotípicas	27
4.3 – Estatística F de Wright	34
4.4 – Distâncias genéticas entre populações	35
5 – CONCLUSÕES	38
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 – Mapa de localização das árvores de <i>C. echinata</i> na população Toró.	10
2 – Mapa de localização das árvores de <i>C. echinata</i> na população Camucim.	11
3 – Perfis isoenzimáticos típicos e seus respectivos locos dos sistemas EST, PO e ACP para as populações de <i>C. echinata</i> .	23
4 - Perfis isoenzimáticos típicos e seus respectivos locos dos sistemas IDH, GOT e SKDH para as populações de <i>C. echinata</i> .	24
5 - Zimogramas dos perfis isoenzimáticos e seus respectivos locos dos sistemas EST, PO e ACP para as populações de <i>C. echinata</i> .	25
6 - Zimogramas dos perfis isoenzimáticos e seus respectivos locos dos sistemas IDH, GOT e SKDH para as populações de <i>C. echinata</i> .	26
7 - Dendrograma das distâncias genéticas não enviesadas de Nei (1978) das três populações de <i>C. echinata</i> , pelo método UPGMA.	36



## LISTA DE TABELAS

	Página
1 – Solução de extração de enzimas das amostras de <i>C. echinata</i> .	12
2 – Sistemas enzimáticos testados em <i>C. echinata</i> .	13
3 – Sistemas tampão eletrodo-gel, utilizados para espécie <i>C. echinata</i> .	14
4 – Sistemas enzimáticos testados, tampões eletrodo-gel e critérios de avaliação da resolução dos géis.	21
5 – Frequências alélicas de doze locos obtidos em três populações de <i>C. echinata</i> na Estação Ecológica do Tapacurá-PE.	28
6 – Resumo dos resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para desvios considerando o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as três populações estudadas de <i>C. echinata</i> .	30
7 – Índices de diversidade dentro e entre populações de <i>C. echinata</i> , na Estação Ecológica do Tapacurá-PE.	31
8 - Número de heterozigosidade observada e esperada ( $H_o$ e $H_e$ ), índices de fixação de Wright ( $f$ ) e teste $\chi^2$ , para os locos da população CAM.	33
9 - Número de heterozigosidade observada e esperada ( $H_o$ e $H_e$ ), índices de fixação de Wright ( $f$ ) e teste $\chi^2$ , para os locos da REF.	33
10 - Número de heterozigosidade observada e esperada ( $H_o$ e $H_e$ ), índices de fixação de Wright ( $f$ ) e teste $\chi^2$ , para os locos da TOR.	34
11 – Resumo das estatísticas F de Wright em doze locos, de três populações de <i>C. echinata</i> , na Estação Ecológica do Tapacurá-PE, em relação à diversidade dentro ( $F_{IS}$ ), total ( $F_{IT}$ ) e entre ( $F_{ST}$ ) populações	35
12 - Matriz de similaridades (diagonal superior) e distâncias genéticas (diagonal inferior) não enviesadas de Nei (1978), nas três populações de <i>C. echinata</i> , na Estação Ecológica do Tapacurá.	36



OLIVEIRA, CASSIA ALZIRA MENDES. Diversidade genética em populações de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) na Estação Ecológica do Tapacurá - PE. 2005. Orientador: Silmar Gonzaga Molica. Colaboradores: Edson Ferreira da Silva e Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira

## RESUMO

Estudos sobre os efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de espécies são essenciais para o planejamento de estratégias de conservação da diversidade. O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) é uma espécie arbórea da Mata Atlântica que sofreu intensa exploração a partir do descobrimento do Brasil, a ponto de ter sido considerada uma espécie com sérios riscos de extinção. Os poucos remanescentes de ocorrência natural são muito fragmentados e com poucos indivíduos, o que pode afetar fortemente a variabilidade genética da espécie. Na Estação Ecológica do Tapacurá (EET), pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizada no município de São Lourenço da Mata – PE, ocorre um raro remanescente com duas populações naturais de *C. echinata*, além de um bosque de reflorestamento. Tais populações têm grande potencial para produção de mudas e vêm sendo usadas para esse fim. Atualmente, há um grande interesse em relação à conservação e repovoamento desta espécie, seja por motivos culturais e sociais ou para a fabricação de instrumentos de cordas de alta qualidade, como violino. Este trabalho teve por objetivo estudar os parâmetros populacionais das duas populações naturais, Mata do Camucim (CAM) e Mata do Toró (TOR), e da população de reflorestamento (REF) da EET que tem servido para reprodução da espécie. Para tanto, utilizou-se eletroforese de isoenzimas em gel horizontal, por meio da análise dos padrões das bandas (presença/ausência) de isoenzimas, para avaliação dos seguintes parâmetros populacionais: frequência alélica, heterozigiosidade, índice de fixação de Wright e divergência genética entre as populações. As análises foram feitas por meio do programa estatístico Biosys-1, considerando 12 locos de nove sistemas isoenzimáticos. As frequências alélicas variaram de 0.050 a 1.00 entre as populações, sendo que o número médio de alelos por loco variou de 2,00 a 2,58. A população CAM apresentou maior heterosigose e a população REF apresentou a maior homozigose. Considerando-se o índice de fixação para cada loco, este variou de -0.905 a 1.000 entre as populações, sendo que TOR

apresentou o maior índice (-0.905), em contraposição à heteroziguidade. Em relação à similaridade entre as populações, CAM e REF foram as mais similares (0,858) em relação CAM e TOR (0,751). Os cuidados com a erosão genética nas populações naturais devem ser maior em relação a TOR e a coleta de sementes visando maior representatividade genética deve ser feita em CAM e TOR, evitando-se REF.



OLIVEIRA, CASSIA ALZIRA MENDES. Genetic diversity in Brazilwood populations (*Caesalpinia echinata* Lam) in the Ecological Station of Tapacurá – PE. 2005 Advisor: Silmar Gonzaga Molica. Collaborators: Edson Ferreira da Silva e Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira

## ABSTRACT

Studies on the effect of forest fragmentation in the genetic structure of species are essential for the planning of biodiversity conservation strategies. Brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam) is an arboreal species of the Atlantic rainforest which suffered intense exploitation since the Portuguese colonization, to the extent of being considered highly threatened of extinction due to deforestation. The few naturally occurring forests are highly fragmented and possess few individuals, which may strongly affect the genetic variability of the species. The Ecological Station of Tapacurá (EET), from the Federal Rural University of Pernambuco, Brazil, presents a rare naturally occurring forest of brazilwood and a reforestation area. These populations have an excellent potential for seedling production and have been used lately for this purpose. Nowadays, there is a broad interest in the conservation and reforestation of the species, either for cultural reasons or for the production of high-quality musical instruments, such as violins. The present research aims to study populational genetics parameters in two distinct naturally-occurring populations - Camucim Woods (CAM) and Toró Woods (TOR) – and the reforestation population (REF) of EET. Isozyme patterns were analyzed through presence/absence of bands in horizontal starch gel electrophoresis. The data yielded parameters such as allelic frequency, heterozygosity, Wright's fixation index and genetic divergence between populations. The statistical analysis was made with the help of the computer program Biosys-1, considering 12 loci of nine isozyme systems. Allelic frequencies varied from 0.50 to 1.00 between populations, and the average allele number per loci varied from 2.0 to 2.58. The population CAM presented higher heterozygosity, while REF presented higher homozygosity. The allelic fixation index ranged from -0.905 to 1.0 between populations, with TOR presenting the higher values (-0.905) in relation to heterozygosity. CAM and REF were more genetically similar (0.858) than CAM and TOR (0.751).



## 1 - INTRODUÇÃO

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) é uma espécie da família Leguminosae e da subfamília Caesalpinioideae, perenifólia ou semicaducifólia, de ocorrência em floresta de mata atlântica litorânea primária, conhecida por vários nomes populares: arabutã, árvore-do-brasil, brasilete, pau-rosado, pau-vermelho e imbirapitinga (Lorenzi, 1992).

Comumente, esta espécie tem de 5 a 15 m de altura e de 15 a 40 cm de DAP, mas pode atingir até 30 m de altura e 100 cm de DAP (diâmetro a 1,30 m do solo) em floresta pluvial. A madeira é vermelha e atualmente preferida para a fabricação de arcos de violino. É uma espécie clímax, que ocupa o estágio médio da floresta, típica de floresta Estacional Semidecidual das Terras Baixas ou Floresta Estacional Caducifólia Costeira (Mata Seca), também ocorrendo em Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica) e chegando até as Matas das Dunas e de Restinga (Carvalho, 1994). Ainda, segundo Carvalho (1994), há variação na época de floração e frutificação, sendo que no Estado de Pernambuco, esta espécie floresce de dezembro a maio e frutifica de outubro a janeiro e a dispersão das sementes é autocórica.

A espécie é basicamente litorânea, nos estados de RN, PB, PE, AL, SE, BA, ES, MG, RJ, mas ao longo desta grande área de ocorrência, devido à drástica redução das populações pela exploração predatória, há apenas populações remanescentes, que requerem cuidados para que sejam conservados e tenham manejo adequado (Carvalho, 1994; Rondon et al., 2003).

Assim, segundo Lima (2004), os registros botânicos confiáveis da ocorrência natural de pau-brasil ainda não representam um quadro real da atual distribuição da espécie. Contudo, foi possível reconhecer pelo menos três padrões morfológicos, que mostram diferença nas folhas (fórmula foliar, forma de folíolo e tamanho) e na estrutura anatômica da madeira. Ainda, segundo Lima (2004), estudos genéticos recentes apoiaram essas diferenças morfológicas e anatômicas entre as populações, mas até o momento nenhuma subespécie ou variedade foi oficialmente reconhecida.

Na estratégia de conservação do pau-brasil, é importante dispor de informações sobre a atual estrutura genética populacional dos remanescentes protegidos, especialmente quanto à diversidade genética das árvores, pois, atualmente, as poucas reservas existentes são áreas limitadas, com pequeno número de indivíduos. Segundo Melo et al. (2003), essa condição é desfavorável à manutenção da variabilidade, tanto para espécies alógamas como autógamas e de reprodução assexual.

Em Estados do Brasil, como Pernambuco, que contam com um raro remanescente de *C. echinata*, estudos em mata nativa como esse têm uma importância maior (Aguiar e Aoki,



1982). O pau-brasil foi considerado extinto em Pernambuco até 1928, quando os professores João Vasconcelos Sobrinho e Bento Pickel verificaram sua presença na Estação Ecológica do Tapacurá, pertencente a UFRPE, em São Lourenço da Mata (Costa, 1985; Soares, 1984). A partir de esforços do professor Roldão Siqueira Fontes, em 1972, foi iniciada uma campanha nacional em defesa do pau-brasil, visando recuperar a sua memória histórica, realizando-se um plantio na mesma área e com sementes locais, que, há muito, dá suporte ao programa de distribuição de sementes e mudas para todo o Brasil (Instituto Pau-brasil, 2004).

Para dar continuidade a esse programa, é essencial o uso de estratégias de conservação da variabilidade genética, tanto a natural quanto a presente em plantio comemorativo ou econômico da espécie, cuja madeira é muito desejada para produção de instrumentos musicais. Para isso, é preciso adequar a população reprodutiva, usando toda a diversidade genética das poucas árvores remanescentes, para realização de plantios com diversidade genética adequada à sobrevivência da espécie. Esses plantios também podem constituir população-base para melhoramento, permitindo a seleção de matrizes adaptadas ao meio e superiores em sanidade, crescimento, forma do fuste e qualidade da madeira.

Assim, para análise da variabilidade genética entre e dentro das populações realizou-se um estudo por meio de eletroforese de isoenzimas em gel de amido, em dois remanescentes naturais e um bosque de reflorestamento de pau-brasil, da Estação Ecológica do Tapacurá, em São Lourenço da Mata – PE.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Diversidade genética em fitopopulações

A conservação e o uso econômico de uma espécie em melhoramento genético depende da conservação da máxima quantidade de germoplasma, tornando essencial a avaliação dos recursos genéticos disponíveis (Brown e Moran, 1981; Moran e Hopper, 1987).

Como tais recursos incluem toda a variação herdável que há em todos os indivíduos de uma espécie, deve-se definir a quantidade e a distribuição da variação genética entre e dentro de populações das espécies, bem como entre espécies (Hamrick, 1983).

Vários fatores ecológicos e da história vital afetam a estrutura genética e a distribuição geográfica de uma espécie, entre os quais sistema reprodutivo, ritmo reprodutivo, morfologia floral e mecanismos de polinização, fenologia, estágio sucessional, associação natural, tamanho da população, amplitude e densidade da distribuição geográfica, estrutura etária e ciclo de vida (Hamrick, 1983; Loveless e Hamrick, 1984 e Torggler et al., 1995).

Para Falconer (1989), a estrutura genética de uma população é definida por forças evolutivas que, conforme a biologia e história de cada espécie, afetam a reprodução e a adaptação, alterando o equilíbrio em frequências alélicas (equilíbrio de Hardy-Weinberg). Estas forças são mutação, seleção e migração, que mudam a direção e as proporções das frequências alélicas de modo previsível, e deriva genética, que é a variação ao acaso em frequências alélicas, por mudanças reversíveis no ambiente: Assim, essas forças podem: a) elevar a variação genética: mutação, que é a alteração, por deleção, adição, substituição ou inversão de pares de bases no DNA que por consequência alteram aminoácidos de proteínas, e migração, que é o fluxo de genes por dispersão de pólen ou sementes, que evita o isolamento sexual, gerando combinações sexuais; b) reduzir a variação genética: seleção, que é multiplicação diferencial de indivíduos de alelos com valor adaptativo.

Assim, em uma espécie, há variação genética entre e dentro de populações, que afeta as suas características ecológicas.

Dentro das populações, a adaptação ao ambiente é um fator essencial que define a estrutura genética, ou seja, influencia na distribuição de alelos do mesmo gene, produzindo distribuição não aleatória no espaço e no tempo, tanto de genótipos (frequência genotípica) quanto de alelos (frequência alélica) (Falconer, 1989).

Para Brown e Weir (1983), dentro da população, a diversidade alélica tem duas interpretações: a) riqueza alélica, que é o número de alelos distintos em uma amostra de



tamanho  $n$ ; e b) equitabilidade, que é a frequência similar de todos alelos. A frequência alélica pode ser calculada diretamente do número de genótipos, pelo número de ocorrências de cada alelo, dividido pelo número total de alelos da amostra. A frequência genotípica é o número de vezes em que o genótipo ocorre dividido pelo número total de genótipos.

Para Weir e Basten (1990), dentro da população, a frequência de heterozigotos, que têm alelos diferentes, indica a diversidade genética. Assim, a diversidade genética pode ser estimada pela heterozigosidade média e pela percentagem de locos polimórficos. Porém, a variação genética é melhor definida, pela metodologia de Nei (1973), em relação a heterozigosidade esperada no equilíbrio de Hardy-Weinberg, em que os alelos têm as mesmas proporções ou as proporções alélicas permanecem constantes por gerações.

Segundo Falconer (1989), outro parâmetro essencial é a estimativa de homozigose, que requer interpretação oposta. Maior proporção de homozigose indica endogamia, ou seja, maior parentesco entre indivíduos. O coeficiente de endogamia ( $F$ ) é maior quanto menor o número de matrizes isoladas por distância, maior o parentesco entre matrizes e maior o número de gerações. Porém, a endogamia depende também do sistema reprodutor.

Na reprodução sexual alogâmica, cruzamento de matrizes aparentadas, descendentes de ancestral comum, com os mesmos alelos, é um processo endogâmico que eleva o parentesco das progênes, elevando a homozigose. Para um loco,  $F$  cresce cerca de  $1/(2N)$ , a cada geração de combinação geral, sendo  $N$  o número de matrizes fêmeas. A heterozigose pode elevar a adaptação e o vigor (heterose), mas a homozigose, na maioria dos casos, é negativa, pois pode reduzir combinação de alelos e causa perda de vigor (depressão endogâmica) por expressão de genes depreciativos (carga genética). Depressão endogâmica é definida pela proporção de redução do crescimento de progênes aparentadas, em relação a progênes não aparentadas. Endogamia pode ser monitorada e reduzida por aumento da representatividade e da distância entre matrizes na coleta de sementes ou por promoção de cruzamentos exogâmicos usando introdução de plantas de outra procedência (Allard, 1971).

Em espécies autóгамas, a endogamia é mais rápida por causa da autofecundação. Para um loco, a heterozigose é reduzida em 50% a cada geração, mas não há depressão endogâmica, pois não há acúmulo de carga genética. Os alelos do mesmo gene podem estar presentes na população, mas, em particular se é pequena a amostra de plantas e de sementes usadas na reprodução, pode haver fixação de um dos alelos. A manutenção da variabilidade é essencial ao êxito de programas de disseminação de uma espécie ou em programa de melhoramento genético (Falconer, 1989).



Segundo Hamrick e Godt (1990), em geral, as espécies arbóreas da floresta tropical têm sistema sexual predominante misto, com alta proporção de locos polimórficos e maior nível de diversidade genética dentro do que entre populações. Conforme Allard (1971) e Shaw e Allard (1982), a restrição do tamanho e isolamento de populações naturais de espécies florestais é a causa mais comum de endogamia, pois, se sementes são dispersas a curta distância, a descendência se desenvolve em torno de árvores-mães, como grupos de indivíduos aparentados, de meios-irmãos ou irmãos germanos. A variação genética é menor dentro de famílias e maior entre famílias.

A variação genética entre populações é medida pelas distâncias genéticas, por técnicas de análise multivariada, como análise de agrupamento, estudo de componentes principais e análise discriminante (Torggler et al., 1995).

## **2.2 - Uso de marcadores bioquímicos no estudo de diversidade genética**

A variação genética pode ser estudada por marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares. Como há poucos marcadores morfológicos oligogênicos e os marcadores moleculares requerem técnicas mais sofisticadas, marcadores bioquímicos têm uso mais acessível, barato e intenso (Torggler et al., 1995; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Marcadores bioquímicos são usados há cerca de 25 anos para pesquisar a estrutura da variação genética em populações, em geral para estudar dispersão de espécies, fluxo gênico entre e dentro de populações, hibridação natural, introgressão gênica, filogenia, ligação gênica, seleção indireta de caracteres mono ou poligênicos, diversidade de germoplasma e identificação de variedades (Torggler et al., 1995; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Em geral, esses marcadores bioquímicos são isoenzimas, ou seja, um grupo de formas moleculares da mesma enzima, com mesma especificidade de substrato, codificadas por mais de um alelo de um gene ou por mais de um gene, detectáveis pela migração diferencial em gel, por eletroforese (Torggler et al., 1995; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Para Torggler et al. (1995), o estudo de isoenzimas é útil em estudos de sistemática, ecologia evolutiva, genética evolutiva, genética de populações, regulação da expressão gênica e do desenvolvimento, ligação gênica, sistema reprodutivo, migração de genes em pólen e sementes, conservação de recursos genéticos e melhoramento genético. Esses temas podem ser sumarizados em: a) estudo de adaptação geográfica; b) medição e descrição da variação; c) estudo de sistemas de cruzamento; d) estudos de ligação gênica.



Assim, isoenzimas são marcadores que revelam variação nos mais diversos organismos, permitindo avanços na genética de populações (Pinto et al., 2001).

Se uma isoenzima é codificada pelos alelos de um loco, é chamada aloenzima e a variação é chamada aloenzimática. Esses alelos em geral são codominantes, quando formas modificadas de enzimas podem se expressar fenotipicamente, não havendo dominância. A variação entre locos é chamada variação isoenzimática.

Se os alelos aloenzimáticos são codominantes, permitem a identificação direta de indivíduos homocigotos e heterocigotos, permitindo a avaliação das proporções genotípicas e alélicas e a comparação com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Robinson, 1998).

Embora isoenzimas sejam produto intermediário dos genes, que se encontram entre o DNA e o fenótipo, possibilitam a genotipagem de heterocigotos em relação a homocigotos, tornando as inferências com dados obtidos de locos aloenzimáticos mais aplicáveis ao seguimento de DNA ocupado pelo loco que aos marcadores em si (Brown, 1978).

Segundo Muona (1989), locos aloenzimáticos podem ser neutros, tendo, como vantagem, a possibilidade de estudo de modelos que envolvem ou não seleção natural. Assim, pode-se estudar a diferença de comportamento entre locos neutros e locos com alelos que têm valor adaptativo, sob efeito de seleção natural.

Para Reis (1996), o uso de marcadores aloenzimáticos baseado em alelos neutros permite o estudo do efeito de forças evolutivas, como o sistema reprodutivo, sem o efeito da seleção, levando a maior compreensão do comportamento de populações naturais. Apesar das restrições ao uso desses marcadores em estimativas de diversidade, devido à neutralidade e codominância, é possível a caracterização de fluxo gênico, endogamia e deriva genética, sendo muito eficazes no estudo da movimentação de alelos em populações naturais.

Para Torggler et al. (1995), a relativa simplicidade, o baixo custo e a precisão são as maiores contribuições de marcadores isoenzimáticos no estudo de genética de populações, como o efeito de endogamia, deriva genética, seleção, sistema reprodutivo e forma de amostragem, na variabilidade entre e dentro de populações.

Fazendo parte do metabolismo essencial das plantas, as isoenzimas em geral estão sempre presentes, sendo marcadores bioquímicos relativamente independentes da idade das plantas, com exceção daquelas que são seletivamente ativadas ou desativadas durante o desenvolvimento do indivíduo. Também são marcadores independentes do uso da planta inteira, podendo ser usados tecidos ou células individualizadas (Torggler et al., 1995).

Deve-se considerar que o estudo de alelos isoenzimáticos não detecta mutações pontuais que não alteram a intensidade de carga elétrica da enzima. Considerando apenas

isoenzimas de uso não particularmente problemático, as principais limitações do uso de isoenzimas são: a) a impossibilidade de realização de mapeamento completo do genoma, pois há limitação do número de marcadores isoenzimáticos; e b) inviabilidade de seleção visando melhoramento, se a ação de isoenzimas não se correlaciona com caracteres úteis (Torggler et al., 1995).

A diversidade genética em populações naturais, estimada por locos alozímicos como marcadores tem sido estudada por amostragens genéticas, pressupondo-se representatividade da amostra de locos. Como são diferentes os efeitos de locos neutros e sujeitos à seleção, pode ser insuficiente a representatividade de locos estudados em relação ao genoma (Brown, 1978).

Em geral, o uso de isoenzimas é acessível para estudo individual de um único loco ou para estudo de um número maior de locos ao mesmo tempo, embora limitado em um número finito de indivíduos e populações (Falconer, 1989).



### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Local de estudo

As três populações de *C. echinata* submetidas ao estudo de variabilidade genética, são duas populações naturais e um bosque de reflorestamento, que estão localizadas na Estação Ecológica do Tapacurá (EET), no município de São Lourenço da Mata-PE.

A EET é um dos Campi da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), que ocupa uma área de aproximadamente 776 hectares, onde, além dos dois remanescentes naturais de mata atlântica, há um bosque de reflorestamento com árvores adultas de pau-brasil, que, há várias décadas, servem para coleta de sementes para produção de mudas de pau-brasil.

A EET situa-se nas seguintes coordenadas: 08° 04' S e 35° 12' W. G. O local tem relevo acidentado, com cerca de 150 m de altitude, e temperaturas predominantemente variando de 24° a 26° C, com chuvas concentradas entre os meses de fevereiro a julho. A cobertura vegetal natural é caracterizada como floresta estacional semidecidual. A EET encontra-se adequadamente protegida, apesar da intensa monocultura da cana-de-açúcar nas áreas do seu entorno.

As três populações estudadas foram identificadas com as seguintes abreviações: Mata do Toró (TOR), Mata do Camucim (CAM) e Reflorestamento (REF).

#### 3.2 - Coleta, transporte e armazenamento das amostras de folhas

Para análise das populações foram amostrados tecidos foliares em 20 indivíduos de cada população, totalizando 60 amostras.

Antes da amostragem de plantas nas populações naturais, mediu-se o diâmetro a 1,30 m do solo (DAP) visando padronização da idade das plantas a serem amostradas ao acaso. Na mata do Camucim, foram amostradas árvores com DAP variando de 3,82 a 40,4 cm e, para a mata do Toró, de 2,90 a 55,06 cm. Foram amostrados indivíduos adultos, que apresentaram DAP superior a 15 cm. Para esses indivíduos, foram tomadas distâncias em relação a um indivíduo central e em relação aos demais, sendo que, na mata do Camucim, essa distância variou de 0,90 a 43,0 m e, na mata do Toró, de 2,00 a 166 m (Figura 1 e 2).

A amostragem no bosque de reflorestamento foi feita também ao acaso procurando ter uma representatividade da distribuição espacial dos indivíduos. Para esta população não foram mensurados dados de DAP já que as árvores têm as mesmas idades entre si.

As amostras foliares foram coletadas no período da manhã, visando ter uma melhor preservação das mesmas, já que neste período do dia a temperatura é mais amena e ocorre maior umidade no material vegetal. As amostras foram embaladas em papel alumínio e identificadas para em seguida serem inseridas em caixa de isopor com gelo, onde permaneceram por, no máximo, oito horas, período de tempo gasto do início da coleta a chegada ao laboratório. No Laboratório de Genética, da UFRPE, as amostras foram transferidas para ultra-*freezer* (-80°C) e mantidas até a ocasião da realização da extração.

### **3.3 - Extração das enzimas**

Para obtenção de extratos protéicos isoenzimáticos, foram pesadas amostras de 0,5 g de tecido foliar de cada indivíduo em balança analítica. Em seguida adicionou-se 1,5 ml de solução extratora protéica (Tabela 1) para realizar a maceração do material em placas de almofariz, sob uma placa de gelo para resfriamento, de acordo com Alfenas et al. (1991).



Legenda



Indivíduo inicial

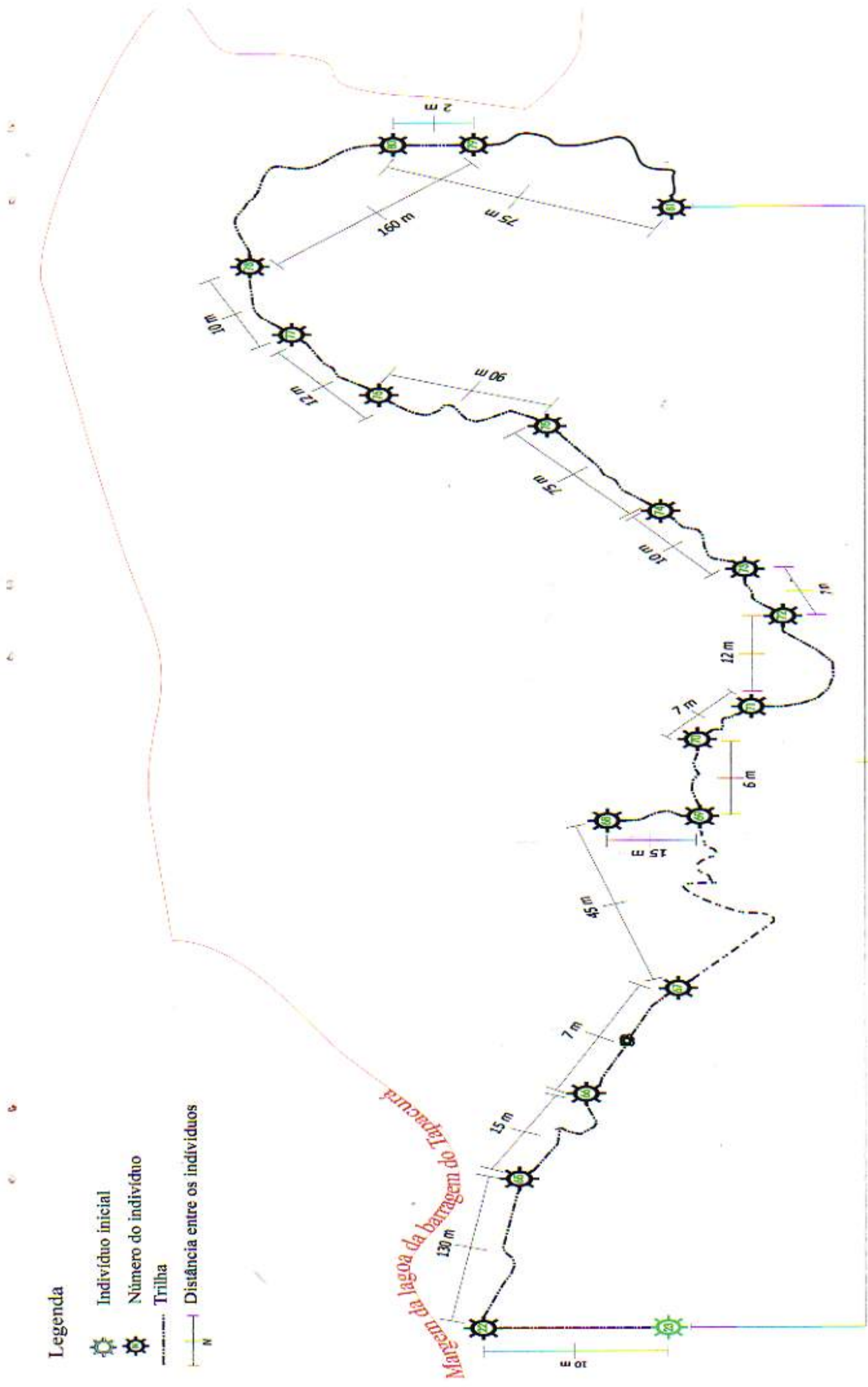
Número do indivíduo

Trilha

Distância entre os indivíduos



N



Aproximadamente 475 metros

Figura - 1 - Mapa de localização das árvores de *C. echinata Lam.* na população do Toró

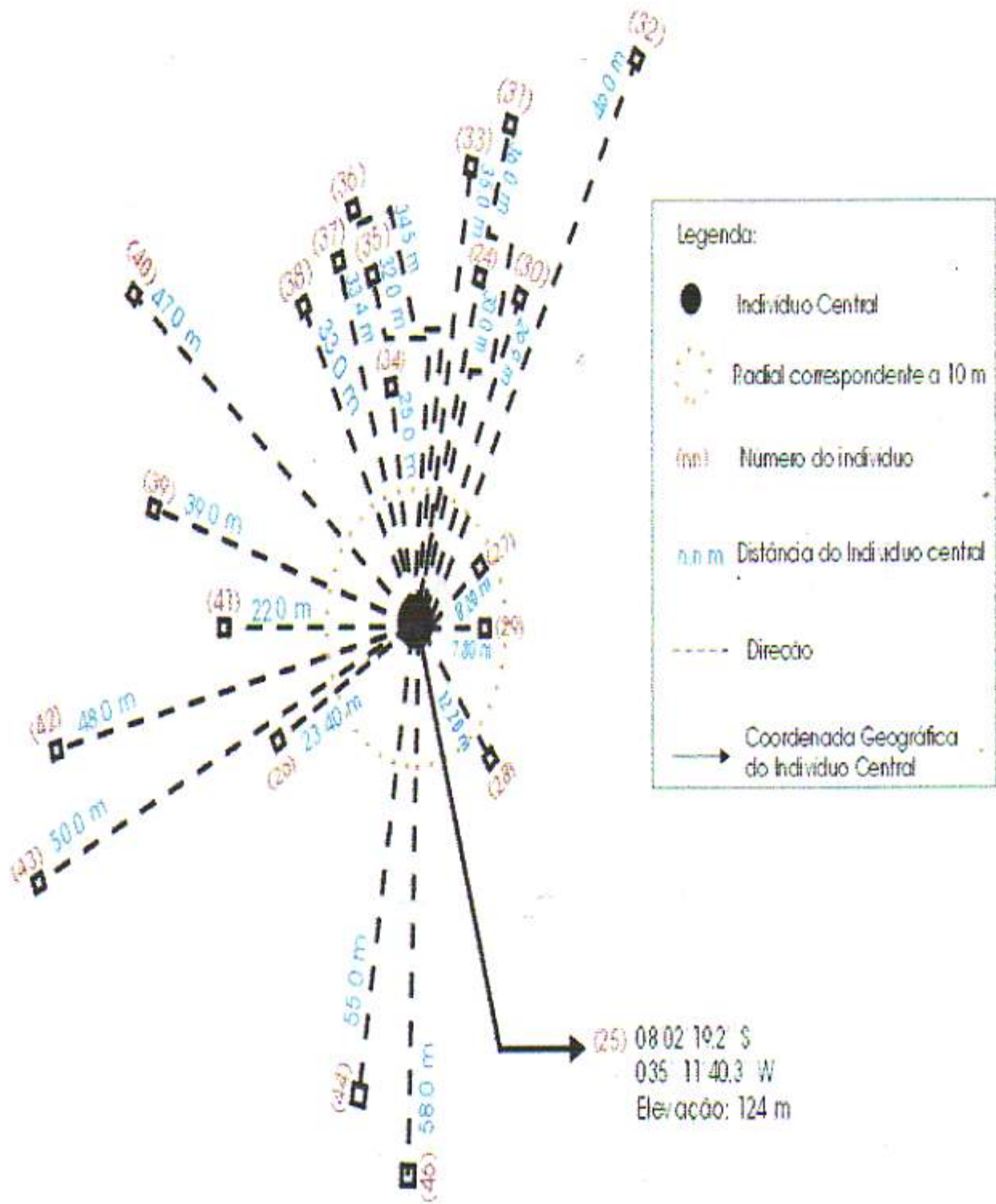


Figura 2 – Mapa de localização das árvores de *C. echinata* na população do Camucim.



Os extratos foliares foram absorvidos em pedaços de papel de filtro “whatman” nº 03 (“wicks”) com 0,5 cm x 1,5 cm, colocados em frascos do tipo “ependorfs” e armazenados em “freezer” vertical para posteriores corridas eletroforéticas.

Tabela 1 – Solução de extração de enzimas das amostras de *C. echinata*.

Reagentes	Quantidade
Tampão A + Tampão B (1ml : 9ml)	2,5 ml
Sacarose	300 mg
PVP-40	300 mg
Tampão A (Borato de Lítio) 0,2M pH 8,3	
Hidróxido de lítio	1,2 g
Ácido bórico	11,89 g
Água destilada	1000 ml
Tampão B (Tris-Citrato) 0,2M pH 8,3	
Ácido Cítrico	1,6 g
Tris	6,2 g
Água destilada	1000 ml

### 3.4 – Procedimentos eletroforéticos

A eletroforese de isoenzimas foi conduzida em meio suporte de gel horizontal de amido de milho (penetrose) 13% obtido junto à indústria da CornProducts Brasil - PE.

O gel foi obtido de modo similar a Oliveira (1999), pesando-se 39 g de penetrose em um frasco de becker, no qual, a seguir era adicionada parte da solução tampão do gel, homogeneizando para formar a solução. Essa solução era posta em frasco de erlenmayer e completada com outra parte da solução, totalizando 300 ml. O estado de gel foi produzido por cozimento em forno microondas com programação prévia para funcionar por cinco minutos, com intervalos regulares 30, 20, 10 e 5 segundos, em que eram feitos movimentos manuais circulares no frasco de erlenmayer, até a solução mudar da cor leitosa a semitransparente. A seguir, a solução era colocada em forma de vidro de 22,5 cm x 10 cm x 1 cm, que era resfriada ao ar livre por 30 minutos, e, posteriormente, em geladeira por 60 minutos.

Para eletroforese, cada gel recebeu 20 amostras (correspondente as 20 árvores de cada população) de extratos protéicos de folhas, e, nas extremidades, dois pedaços de papel de filtro com solução marcadora azul de bromofenol a 1%, para marcar a linha de frente de migração. Durante a migração, os géis foram mantidos à 4° C, em refrigerador, e, após uma hora de corrida, os “wicks” eram retirados, conforme indicado por Alfenas et al. (1991).

Foram testados onze sistemas enzimáticos (Tabela 2) e três sistemas eletrodo-gel para a espécie *C. echinata* (Tabela 3). Na corrida em solução tampão Tris Citrato (TC) usou-se voltagem constante (140 V) com duração de 20 horas e migração de 7 cm – 8 cm; na corrida em Lítio Borato (LB), usou-se voltagem constante (300 V) duração de 20 horas e migração de 7 cm; em Tris Citrato Borato (TCB), a voltagem era constante (150 V) durante a pré-corrida e 300 V até o final da corrida com duração de 7 horas e migração de 7 cm (Oliveira, 1999).

Ao final da corrida, os géis foram cortados em três fatias e preparados para a coloração específica e revelação de cada enzima.

As etapas subseqüentes foram o aquecimento em estufa à 37° C para todos os sistemas exceto a peroxidase (PO) e a catalase (CAT), limpeza, interpretação, esquematização dos zimogramas, e fotodocumentação dos géis.

Tabela 2 – Sistemas enzimáticos testados em *C. echinata*.

Enzima	Código	Sigla
Peroxidase	PO - EC 1.11.1.7	PO
Xiquimato desidrogenase	SKDH-EC 3.1.1.1	SKDH
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	GOT-EC 2.6.1.1	GOT
Alfa-Esterase	Alfa-EST-EC 3.1.1.1	α-EST
Glucose Desidrogenase	GLUDH- EC 1.1.1.47	GLUDH
Fosfatase Ácida	ACP-EC 3.1.3.2	ACP
Isocitrato Desidrogenase	IDH-EC 1.1.1.42	IDH
Álcool desidrogenase	ADH-EC 1.1.1.1	ADH
Catalase	CAT-EC 1.11.1.6	CAT
Fosfatase Alcalina	ALP-EC 3.1.3.1	ALP
Glutamato Desidrogenase	GDH-EC 1.4.1.3	GDH



Tabela 3 – Sistemas tampão eletrodo-gel utilizados para espécie *C. echinata*.

Denominação	Tampão-Eletrodo	Tampão-Gel
Tris Citrato (TC)	0,223M Tris (27,00 g/l) 0,086M Ác. Cítrico (18,07 g/l) pH 7,5 – ajustar para o pH desejado com Tris	Diluição a 7% do Tampão do eletrodo
Lítio Borato (LB)	0,192M Ac. Bórico (11,87 g/l) pH 8,3 – ajustar para o pH desejado com Hidróxido de Lítio ( $\approx$ 1,59 g/l)	9 partes do tampão 0,052M Tris/0,008M Ac. Cítrico + 1 parte tampão do eletrodo
Tris Citrato Borato (TCB)	0,3M Ac. Bórico pH 8,3 – ajustar para o pH desejado com NaOH 4N	2,5% de 0,015M Tris 2,5% de 0,036M Ac. Cítrico pH 8,3 titular para o pH desejado com Tris

### 3.5 - Protocolos de análises

A seguir, são apresentados os protocolos para os nove sistemas enzimáticos aprovados para eletroforese de *C. echinata*:

#### a) PO

3-amino-9etil-carbazole-----	50mg
Dimetilformamida (DMF)-----	5ml
CaCl <sub>2</sub> 1M-----	2ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)-----	2ml
Tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0-----	100ml

Obs: Dissolveu-se, primeiramente, o carbozole em DMF e, a seguir adicionou-se os demais componentes, imediatamente antes da coloração.

#### b) SKDH

NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub> -----	0,01g (1ml)
MTT-----	0,01g (1ml)
PMS-----	0,001g (1ml)
Ácido Xiquímico-----	0,04g
Tris-HCl 0,1M pH 8,5-----	47ml

#### c) GOT

##### Solução Substrato pH 7,4

H <sub>2</sub> O destilada-----	100ml
L-Ácido Aspártico-----	0,1331g
α-Ácido Ketoglutárico-----	0,0365g
PVP-40-----	0,5g
EDTA-----	0,05g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	1,42g

##### Coloração

Solução Substrato-----	50ml
Fast Blue BB salt-----	0,08g



d)  $\alpha$ -EST**Solução A:**1,2g  $\alpha$ -Naftil Acetato em 30ml acetona (99,5%)-----1,5ml

Tampão fosfato de Sódio pH 6,0-----58,5ml

**Solução B:**

N-Propanol (Isopropanol)-----4,0ml

Fast Garnet GBC-----0,16g

Tampão Fosfato pH 6,0-----11,0ml

Obs<sub>1</sub>: Para preparar o tampão Fosfato pH 6,0 misturou-se o Fosfato de Sódio monobásico 0,2M e o bibásico 0,38M numa relação de 5:1 e mais quatro partes de H<sub>2</sub>O destilada; Obs<sub>2</sub>: imergiu-se o gel na solução A por 20 minutos deixando o mesmo na incubadora. Em seguida adicionou-se a solução B.

e) **GLUDH**

D-Glucose-----1g

NAD<sup>+</sup>, Na<sub>2</sub>-----2ml (20mg)

MTT ou NBT-----2ml (20mg)

PMS-----2 ml

Tris-HCl 0,2M, pH 8,0-----

100ml

f) **ACP** $\alpha$ -Naftil Fosfato Ácido de Sódio-----100mg

Fast garnet GBC salt-----100mg

MgCl<sub>2</sub> (1%)-----1ml

Tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0-----100ml

g) **IDH**DL-Ácido Isocitríco Na<sub>3</sub>-----0,08gNADP, Na<sub>2</sub>-----0,01g (1ml)

MTT-----0,01g (1ml)

PMS-----0,001g (1ml)

MgCl<sub>2</sub>-----1ml

Tris-HCl 0,1M pH 8,0-----46ml

#### h) ADH

Etanol (95% v/v)-----20ml

NAD<sup>+</sup>, Na<sub>2</sub>-----2ml (20mg)

MTT ou NBT-----2ml (20mg)

PMS-----2ml (2mg)

Tris-HCl 0,2M, pH 8,0-----100ml

#### i) CAT

Água destilada-----100ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-----20ml

Iodeto de potássio (1%)-----100ml

Ácido acético-----1ml

Obs<sub>1</sub>: Imergiu-se o gel na solução de água destilada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 minuto. Em seguida realizou-se a lavagem do mesmo e adicionou-se a solução de iodeto de potássio acidificada com ácido acético por 2 minutos.

### 3.6 - Leitura e interpretação dos zimogramas

A leitura e a foto-documentação dos zimogramas foram realizadas logo após a revelação das isoenzimas.

Após a revelação dos géis, a interpretação de zimogramas foi realizada para a identificação do genótipo de cada indivíduo das populações, nos locos que determinam cada enzima.

A diversidade foi estimada a partir das freqüências genóticas, freqüências alélicas e percentagem de locos polimórficos e número de alelos por loco. A relação homozigidade heterozigidade foi interpretada considerando fatores evolutivos naturais ou provocados pelo homem, como seleção, deriva genética, hábito reprodutivo da espécie, como indicativo de estratégia de manejo da diversidade do germoplasma (Huang et al., 1994; Oliveira, 1999).

As regiões de atividades foram numeradas em ordem decrescente de mobilidade, em relação à origem, de modo que a região com as bandas eletroforéticas de maior



mobilidade para o sistema enzimático foi identificada como região 1 (ex: Po-1). Para cada loco, o alelo de maior migração recebeu a denominação de A e os demais B, C conforme a distância de migração seguinte.

### 3.7 - Metodologia estatística

Após interpretação dos zimogramas, foi feita a tabulação dos dados para a análise estatística, através do programa de computador Biosys-1 (Swofford e Selander, 1981; 1989).

#### 3.7.1 - Estrutura genética F de Wright

A estrutura genética das populações foi caracterizada pelas estatísticas  $\hat{F}(\hat{F}_{IT}, \hat{F}_{IS}, \hat{F}_{ST})$ , conforme Wright (1951; 1965), através do Biosys-1 (Swofford e Selander, 1981; 1989). Essas três estatísticas são observadas em conjunto na expressão:

$$1 - \hat{F}_{IT} = (1 - \hat{F}_{IS})(1 - \hat{F}_{ST})$$

Sendo:  $\hat{F}_{IT}$  = índice de fixação alélica para o conjunto das populações,  
 $\hat{F}_{IS}$  = índice médio de fixação alélica dentro das populações e  
 $\hat{F}_{ST}$  = divergência genética entre populações.

A obtenção desses índices foi efetuada conforme Nei (1975):

$$\text{onde: } \hat{F}_{IS} = \frac{\sum \hat{H}_0}{\sum \hat{H}_e}; \quad \hat{F}_{IT} = \frac{\hat{H}_e}{2(\bar{p}\bar{q} + \bar{p}\bar{r} + \bar{q}\bar{r})}; \quad \hat{F}_{ST} = \frac{\sum \sigma^2_{\bar{p}}}{[\sum \bar{p}(1 - \bar{p})]}$$

sendo:

$\hat{H}_e$  = heterozigosidade média esperada entre populações.

$\hat{H}$  = heterozigosidade média observada entre populações.

$$\therefore \hat{H}_e = \sum \hat{H}_i / s$$

onde:  $s$  = número de populações.

$\bar{p}, \bar{q}, \bar{r}$  = média aritmética das frequências alélicas entre locos, entre populações.

$\sum \sigma^2_{pi}$  = somatório das variâncias entre alelos iguais de populações diferentes

$\hat{p}_i = \bar{p}, \bar{q}, \bar{r}$ .

Para Wright (1965), em muitas circunstâncias, os valores de  $\hat{F}_{IS}$  e  $\hat{F}_{IT}$  poderiam ser negativos, indicando um excesso de heterozigotos, e valores positivos indicariam deficiência dos mesmos.

Para verificar se a diferença entre  $\hat{F}_{IS}$  e  $\hat{F}_{IT}$  é significativamente diferente de zero, ao nível de locos, utilizou-se o teste de qui-quadrado:  $\chi^2 = N\hat{F}(k - 1)$ , sendo os graus de liberdade  $GL = [k(1 - k)] / 2$ , em que  $\hat{F}$  é o índice de fixação ( $\hat{F}_{IS}$  ou  $\hat{F}_{IT}$ );  $N$  = tamanho total da amostra e  $k$  = número de alelos (Li e Horvitz, 1953). Para a estatística  $\hat{F}_{ST}$ , o teste de significância usado para cada loco foi:  $\chi^2 = 2N\hat{F}_{ST}(k - 1)$ ,  $GL = (k - 1)(s - 1)$ , sendo:  $N$  = tamanho total da amostra,  $k$  = número de alelos e  $s$  = o número de populações, conforme Workman e Niswander (1970).

### 3.7.2 - Distâncias/identidades genéticas

Com os dados estimados, pelo programa de computador Biosys-1 (Swofford e Selander 1981, 1989), foi montada uma matriz de distâncias/similaridades genéticas não-enviesadas, conforme Nei (1978), e uma representação gráfica de uma análise de agrupamento através de um dendrograma - UPGMA (método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas), usando o coeficiente de identidade genética não viesada de Nei (1978).

### 3.7.3 - Divergência genética

A diversidade genética foi definida pelo uso de frequências alélicas da geração amostrada, não tendo nenhuma pressuposição acerca da genealogia dos indivíduos, bem como da seleção e migração no passado, pois essa abordagem pode ser empregada para qualquer situação, com ou sem seleção.



A divergência genética fundamenta-se na distribuição da heterozigosidade ou diversidade genética total ( $F_{IT}$ ), entre ( $F_{IS}$ ) e dentro ( $F_{ST}$ ) das subpopulações, sendo:

$$F_{IT} = F_{IS} + F_{ST}$$

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Sistemas enzimáticos testados

Foram testados onze sistemas enzimáticos em três diferentes tampões de eletrodo-gel, cujos resultados estão relacionados na Tabela 4. Dentre estes, foram escolhidos nove sistemas tendo, como critérios, a qualidade da resolução dos géis e a possibilidade de agrupamento de diversos sistemas em um tampão eletrodo-gel.

Os nove sistemas escolhidos foram: PO, SKDH, GOT,  $\alpha$  - EST, GLUDH, ACP, IDH, ADH e CAT. Com relação ao agrupamento por tampão eletrodo-gel, ficaram agrupados SKDH,  $\alpha$  - EST, GLUDH, IDH, ADH e CAT no tampão eletrodo-gel TC; ACP e PO no LB. Não foi possível agrupar o sistema GOT e este foi o único que apresentou uma boa resolução nos tampões TCB e LB.

Tabela 4. Sistemas enzimáticos testados, tampões eletrodo-gel e critérios de avaliação da resolução dos géis.

Sistema Enzimático	Tampão Eletrodo-Gel		
	TC	TCB	LB
PO	+	±	+
SKDH	+	n.r	n.r
GOT	±	+	+
$\alpha$ - EST	+	n.r	n.r
GLUDH	+	-	n.r
ACP	±	±	+
IDH	+	n.r	n.r
CAT	+	-	-
ADH	+	n.r	n.r
ALP	-	n.r	n.r
GDH	n.r	-	-

Legenda: + (resolução ótima); ± (resolução regular); - (resolução ruim); n.r. (não realizado)

Para a interpretação dos zimogramas, foram analisados os locos de nove sistemas enzimáticos. Os zimogramas obtidos sugerem a existência de doze locos aparentes, os quais foram utilizados nas análises, são eles: Po – 2 locos, Skdh – 1 loco,



Got – 1 loco,  $\alpha$  - Est – 1 loco, Gludh – 1 loco, Acp – 2 locos, Idh – 1 loco, Adh – 1 loco e Cat – 2 locos.

Para o sistema PO, observaram-se dois locos interpretáveis e um padrão monomórfico para as três populações estudadas. Foram observados três alelos para as populações CAM, REF e TOR.

Para o sistema SKDH, observou-se um único loco para as três populações. As populações CAM e TOR apresentaram três alelos e a população REF apresentou dois alelos.

O sistema GOT em todas as três populações apresentou um único loco. Para população CAM obteve-se dois alelos, mas as populações REF e TOR apresentaram o alelo 1 fixado.

Para o sistema  $\alpha$  - EST, observou-se uma zona de revelação de bandas, entre a de migração mais rápida ( $\alpha$  - Est – 1) e a que foi codificada como  $\alpha$  - Est – 2, que possivelmente representa um outro loco, mas que não foi incluída na análise por estar ausente em um grande número de indivíduos. No entanto, para o loco considerado as populações CAM e REF apresentaram três alelos e a população TOR dois alelos.

Para o sistema GLUDH, observou-se um único loco para todas as três populações. A população CAM apresentou três alelos enquanto que as demais apresentaram dois alelos.

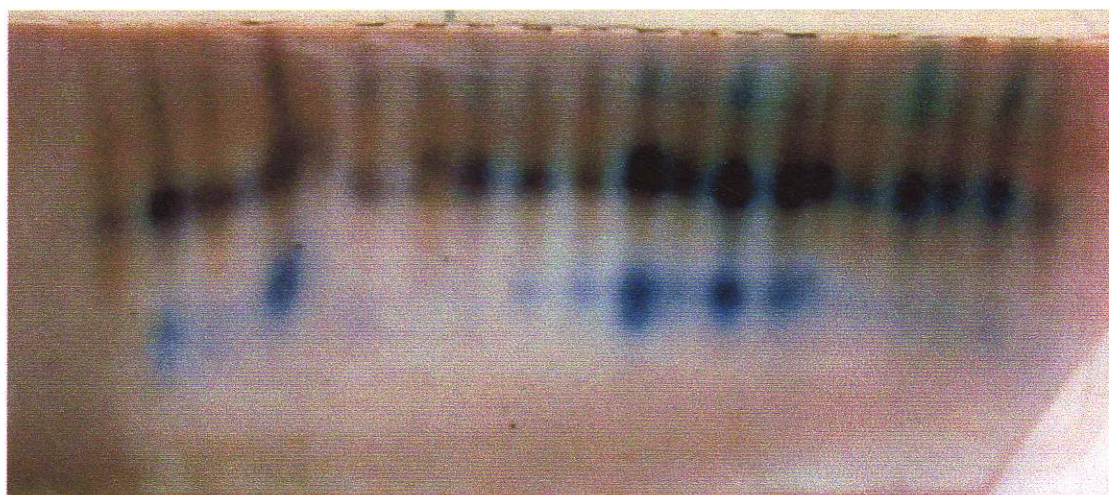
Para o sistema ACP, observaram-se dois locos interpretáveis para as três populações. Com relação ao Acp – 1 as populações REF e TOR apresentaram dois alelos e a população CAM apresentou o alelo 1 fixado. Para o Acp – 2 a população TOR apresentou dois alelos e as demais populações observou-se a fixação de alelos, para as populações CAM e REF observou-se a fixação do alelo 2.

Para o sistema IDH, observou-se um único loco para as três populações. A população CAM apresentou três alelos, a população REF apresentou dois alelos e a população TOR apresentou o alelo 1 fixado.

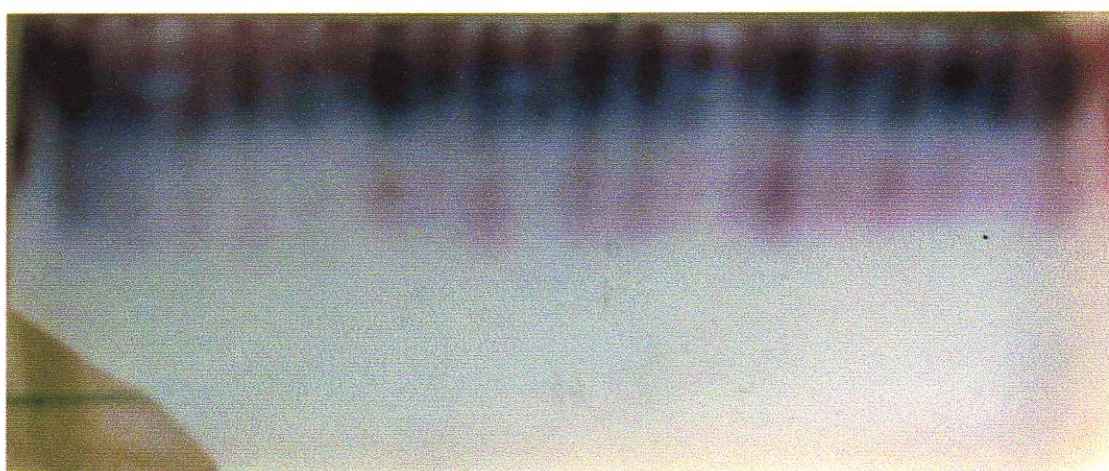
Para o sistema ADH, observou-se um único loco para as três populações. As populações CAM e REF apresentaram três alelos e a população TOR dois alelos.

Para o sistema CAT, observaram-se dois locos interpretáveis para as três populações estudadas. Nas Figuras 3 e 4 são apresentados perfis de géis para alguns dos sistemas isoenzimáticos utilizados e nas Figuras 5 e 6 são apresentados os zimogramas dos referidos perfis.

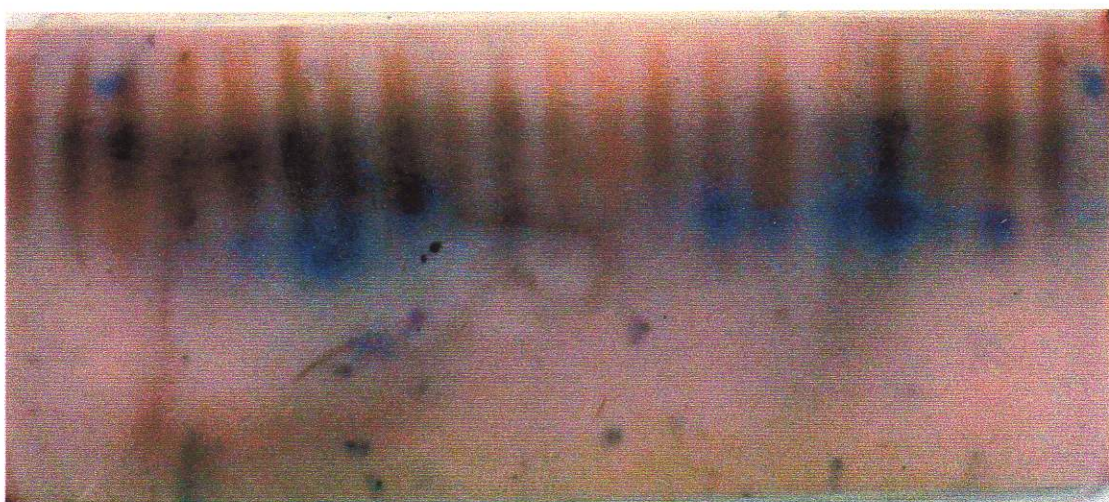




A



B



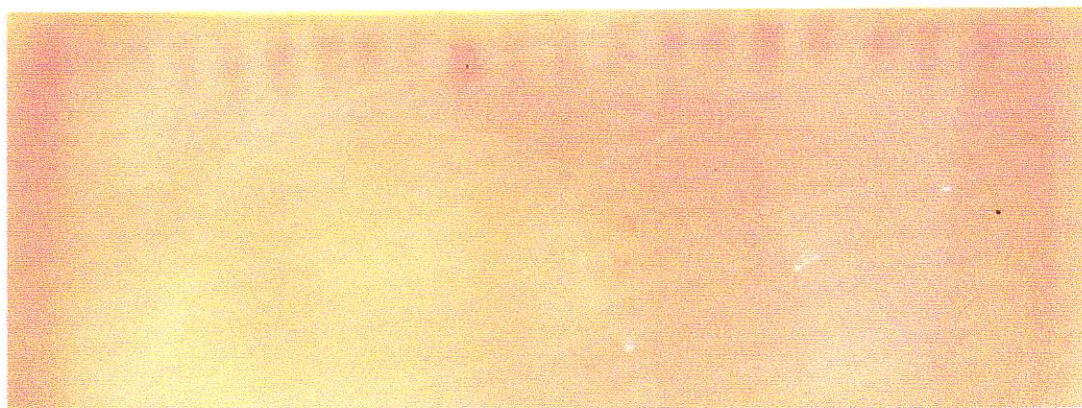
C

Figura 3 – Perfis isoenzimáticos típicos e seus respectivos locos dos sistemas EST (A), PO (B) e ACP (C) para as populações de *C. echinata*.

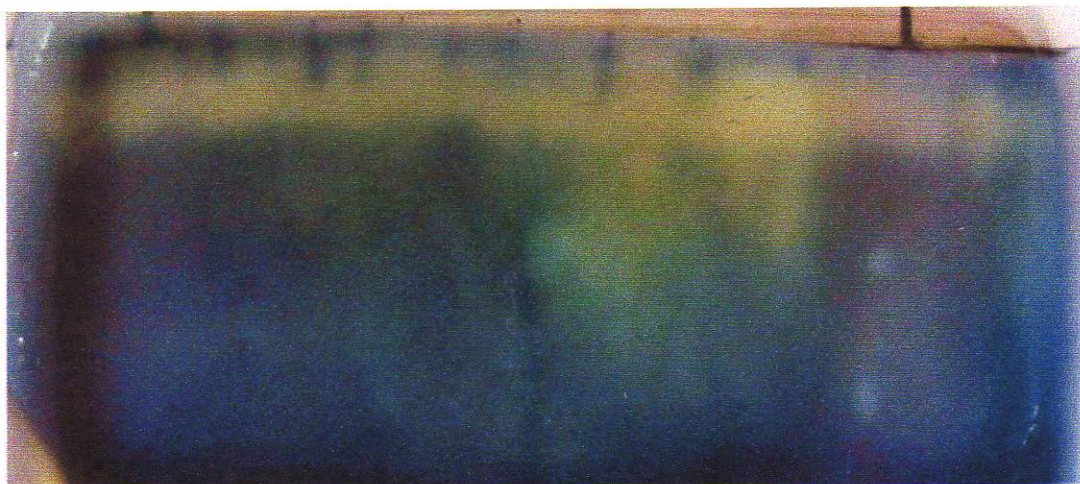




D



E



F

Figura 4 – Perfis isoenzimáticos típicos e seus respectivos locos dos sistemas IDH (D), GOT (E) e SKDH (F) para as populações de *C. echinata*.



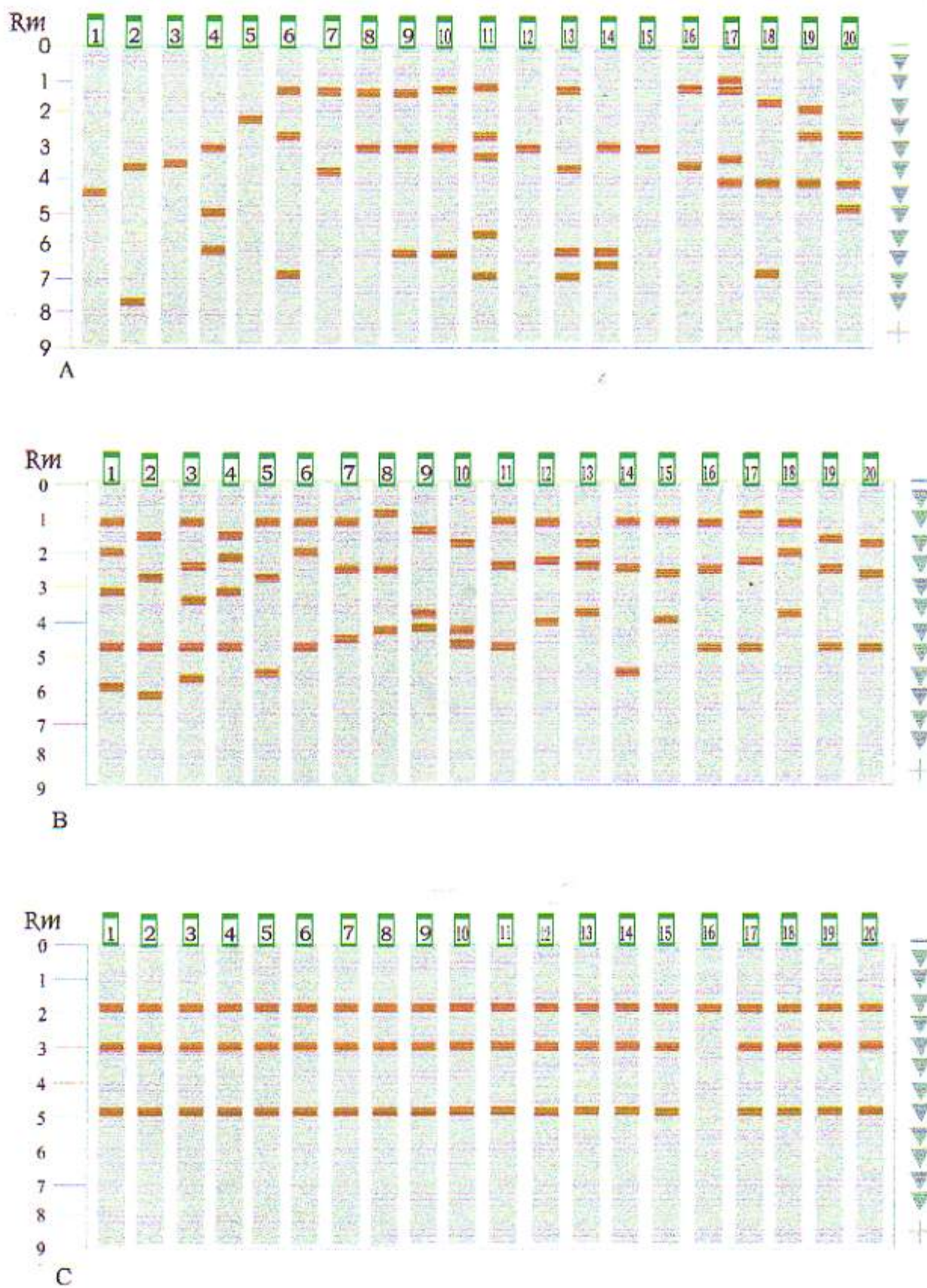


Figura 5 – Zimogramas dos perfis isoenzimáticos e seus respectivos locos dos sistemas EST (A), PO (B) e ACP (C) para as populações de *C. echinata*.



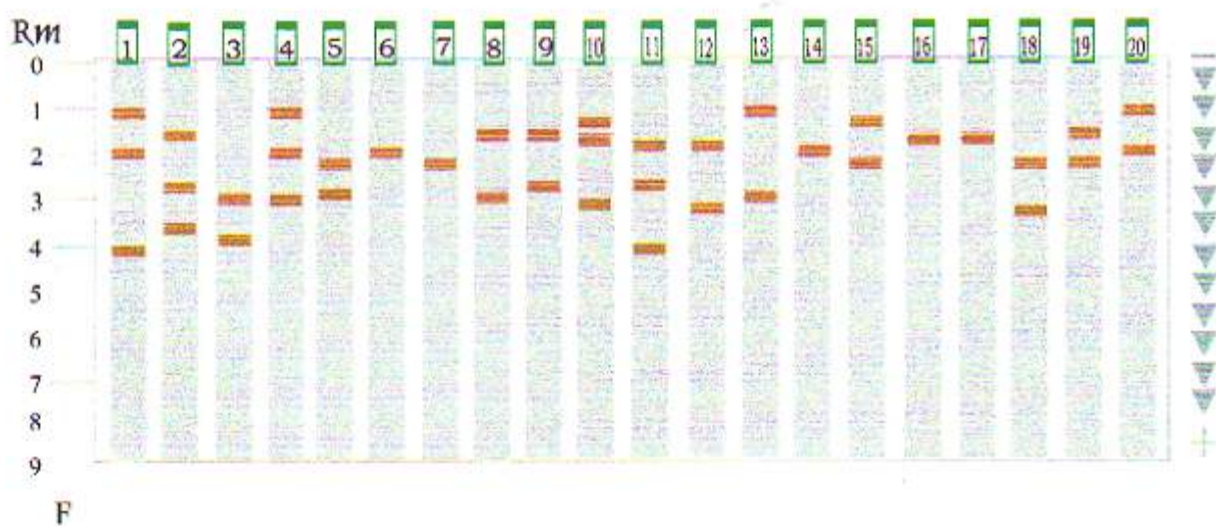


Figura 6 – Zimogramas dos perfis isoenzimáticos e seus respectivos locos dos sistemas IDH (D), GOT (E) e SKDH (F) para as populações de *C. echinata*.

## 4.2 – Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas obtidas para os doze locos analisados nas três populações estudadas encontram-se na Tabela 5.

Os valores obtidos variaram desde a completa fixação do alelo como ocorre para o alelo 1 do sistema Got nas populações REF e TOR, até frequências muito baixas (0,050), como no alelo 2 do sistema Po-1 na população do TOR.

Pode ser constatado, ainda na Tabela 5, que a população mais polimórfica, em relação aos alelos estudados, foi CAM, com exceção dos locos Acp-1 e Acp-2 pode ser constatado variação isoenzimática em todos os sistemas utilizados.

A presença de alelos exclusivos foi verificada apenas na população CAM em relação aos sistemas Po-1, Gludh, Idh, Cat-1 e Cat-2, onde ocorre o alelo 3, que não ocorre nas demais populações.

Os valores do teste  $\chi^2$  para Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação as frequências alélicas obtidas para os alelos são apresentados na Tabela 6. Verifica-se que as populações naturais CAM e TOR apresentam apenas três locos em equilíbrio, considerando-se dez locos analisados. Portanto, estes dados fornecem indícios que as duas populações estão passando por processos que desestabilizam o equilíbrio, seja mutação, seleção ou deriva genética.

A população REF apresentou valores de  $\chi^2$  não significativos para cinco locos, considerando dez locos. Isto provavelmente ocorreu em decorrência da não representatividade na coleta das sementes que foram utilizadas para implantação do REF.



Tabela 5 - Frequências alélicas de 12 locos obtidos em três populações de *C. echinata* na Estação Ecológica do Tapacurá – PE

Loco	Populações		
	CAM	REF	TOR
Po-1			
(N)	20	19	20
A	0,375	0,895	0,950
B	0,225	0,105	0,050
C	0,400	0,000	0,000
Po-2			
(N)	20	7	20
A	0,225	0,143	0,750
B	0,650	0,714	0,150
C	0,125	0,143	0,100
Skdh			
(N)	20	14	17
A	0,425	0,714	0,118
B	0,150	0,286	0,765
C	0,425	0,000	0,118
Got			
(N)	18	13	17
A	0,833	1,000	1,000
B	0,167	0,000	0,000
Est			
(N)	20	15	19
A	0,625	0,800	0,579
B	0,275	0,100	0,421
C	0,100	0,100	0,000
Gludh			
(N)	20	10	17
A	0,425	0,600	0,059
B	0,275	0,400	0,941
C	0,300	0,000	0,000

(N) = número de indivíduos

Tabela 5 – Continuação...

Loco	Populações		
	CAM	REF	TOR
<b>Acp-1</b>			
(N)	19	9	17
A	1,000	0,944	0,912
B	0,000	0,056	0,088
<b>Acp-2</b>			
(N)	20	10	13
A	0,000	0,000	0,462
B	1,000	1,000	0,538
<b>Idh</b>			
(N)	20	19	17
A	0,550	0,842	1,000
B	0,300	0,158	0,000
C	0,150	0,000	0,000
<b>Adh</b>			
(N)	20	18	20
A	0,400	0,028	0,475
B	0,075	0,944	0,525
C	0,525	0,028	0,000
<b>Cat-1</b>			
(N)	20	20	20
A	0,175	0,375	0,100
B	0,600	0,625	0,900
C	0,225	0,000	0,000
<b>Cat-2</b>			
(N)	20	7	7
A	0,100	0,429	0,571
B	0,600	0,571	0,429
C	0,300	0,000	0,000

(N) = número de indivíduos



Tabela 6 – Resumo dos resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) dos desvios para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as três populações estudadas de *C. echinata*.

Locos	Populações					
	CAM		REF		TOR	
	GL	$\chi^2$	GL	$\chi^2$	GL	$\chi^2$
Po-1	3	11,68*	1	10,65*	1	5,093*
Po-2	3	10,30*	3	3,234 <sup>n.s.</sup>	3	24,38*
Skdh	3	8,123*	1	10,39*	3	9,583*
Got	1	12,37*	-	-	-	-
Est	3	0,931 <sup>n.s.</sup>	3	0,009 <sup>n.s.</sup>	1	16,03*
Gludh	3	14,67*	1	1,833 <sup>n.s.</sup>	1	0,000 <sup>n.s.</sup>
Acp-1	-	-	1	1,000 <sup>n.s.</sup>	1	0,000 <sup>n.s.</sup>
Acp-2	-	-	-	-	1	0,000 <sup>n.s.</sup>
Idh	3	4,805 <sup>n.s.</sup>	1	13,07*	-	-
Adh	3	12,15*	1	0,000 <sup>n.s.</sup>	1	13,77*
Cat-1	3	1,992 <sup>n.s.</sup>	1	13,19*	1	11,22*
Cat-2	3	10,86*	1	4,293*	1	4,293*

\*P < 0,05 e n.s. = não significativo

Os resultados obtidos em relação aos índices de diversidade estão expostos na Tabela 7. O número médio de alelos por loco variou de 2,00 a 2,58, para as três populações. Valores próximos a esse têm sido encontrados em outras espécies. Em *Chorisia speciosa* St. Hil, Souza et al. (2004) encontrou 2,38 alelos por loco. Conforme Hamrick e Godt (1990), para a média de 110 espécies arbóreas, o número médio de alelos por locos foi de 2,19.

A porcentagem média de locos polimórficos, para as populações estudadas, foi de 83,33 %, valor que indica ter havido boa representatividade populacional. Segundo Moraes (1997), esse valor é inferior a 100% quando são incluídos nas análises locos monomórficos, como feito neste trabalho. Essa porcentagem de locos polimórficos

estimados para o conjunto das populações, foram maiores que os valores estimados por Hamrick e Godt (1990) e Souza et al. (2004), que foram de 64,7% e 75%, respectivamente.

Ainda na Tabela 7, são apresentados os valores de heterozigoses médias, a observada ( $H_o$ ) e a esperada ( $H_e$ ), para cada loco, nas populações de *C. echinata*, que variaram de 0,073 a 0,475 e 0,286 a 0,468, respectivamente. Apenas a população REF apresentou alto nível de homozigose (>10%). Sendo que as demais populações (CAM e TOR) apresentaram alto nível de heterozigidade. A alta homozigidade em REF pode ser explicada pelo fato de que, na ocasião da coleta de sementes para formação de mudas que originaram REF, pode ter sido utilizadas poucas plantas, não sendo representada a variabilidade da população original, provavelmente CAM.

A população CAM apresentou baixo índice de fixação alélica -0,015 e as populações TOR e REF apresentaram altos índices, 0,468 e 0,746, respectivamente. Portanto, com relação às populações naturais, a endogamia afeta mais TOR do que CAM. Em relação à população REF, os resultados reforçam os indícios de que a coleta de sementes para produção de mudas e posterior implantação do bosque ocorreu em poucas matrizes de CAM, que, por estarem distantes umas das outras, produziram sementes por autofecundação, fato que, em decorrência, gerou efeito de estrangulamento (efeito de fundador), gerando indivíduos endogâmicos.

Tabela 7 – Índices de diversidade dentro das populações de *C. echinata*, na Estação Ecológica do Tapacurá – PE.

População	Tamanho médio da amostra por locos	Número médio de alelos/loco	Porcentagem locos polimórficos	Heterozigidade média		Índice de fixação (F)
				Observado	Esperada (HW)*	
CAM	19,8	2,6	83,3	0,475	0,468	-0,015
	(0,2)	(0,3)		(0,116)	(0,069)	
REF	13,4	2,1	83,3	0,073	0,288	0,746
	(1,4)	(0,2)		(0,035)	(0,058)	
TOR	17,0	2,0	83,3	0,152	0,286	0,416
	(1,1)	(0,2)		(0,082)	(0,061)	

\* estimativa não enviesada de NEI (1978)

Hamrick e Godt (1990) fizeram revisão em 653 estudos de diversidade genética por isoenzimas envolvendo 449 espécies de plantas. Nesse estudo, encontraram



diversidade genética média em nível populacional de 0,160, para gimnospermas, 0,149, para espécies arbóreas, 0,159, para espécies de ampla distribuição, 0,109, para espécies tropicais, 0,124, para espécies de polinizada por animais, e 0,123, para espécies com dispersão pelo vento. Pode-se observar que a diversidade genética da população CAM (0,475) foi superior às médias de todos estes casos citados, o que indica que esta população apresenta um nível satisfatório de diversidade genética.

Valores próximos a esse têm sido encontrados em populações naturais de outras espécies. Em *Bauhinia forficata* Link, Santos (1994) encontrou o valor de 0,451 para heteroziguidade em uma população natural. Já Murawski e Bawa (1994) encontraram, em *Stemonoporus oblongifolius*, uma heteroziguidade média por população de 0,282. Em *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers., Gusson (2003) encontrou o valor de 0,431 para heteroziguidade esperada e o valor de 0,371 para heteroziguidade observada. Já Moraes (1997), encontrou, em *Cryptocarya moschata* Nees, heteroziguidade esperada de 0,336 e heteroziguidade observada de 0,330. Lacerda (1997) encontrou, em *Myracrodruon urundeuva* (Fr. Allem.), heteroziguidade média de 0,121. Esses valores são próximos aos encontrados por Moraes (1992), que foi de 0,110 e 0,160, na mesma espécie (*M. urundeuva*), na região de Bauru (SP) e Selvíria (MS). Portanto, os valores de heterozigose encontrados neste trabalho para *C. echinata* são semelhantes aos encontrados na literatura para outras espécies arbóreas em condições naturais, indicando ser uma tendência para o grupo de espécies arbóreas.

Nas Tabelas 8, 9 e 10, podem ser observadas as estimativas de  $f$  (índice de fixação) para os locos polimórficos das populações estudadas de *C. echinata*. Na população CAM, nos locos Po-1, Skdh, Gludh, Idh e Adh, o  $f$  foi negativo, indicando excesso de heterozigotos. Nos demais locos, os valores de  $f$  foram altos e positivos, mostrando excesso de homozigotos, o que pode ser decorrente de endogamia. Nas demais populações, o índice de fixação alélica variou desde valores negativos até positivos, ou seja, na população REF ( $f = -0,176$  a  $f = 1,000$ ) e população TOR ( $f = -0,905$  a  $f = 1,000$ ).

Tabela 8 – Heterozigosidade observada e esperada ( $H_o$  e  $H_e$ ), índices de fixação de Wright ( $f$ ) e teste  $\chi^2$  para os locos da população CAM.

Locos	Heterozigose observada	Heterozigose esperada	Índice de fixação (F)	$\chi^2$
Po-1	18	12,975	- 0,387	1,946
Po-2	4	10,225	0,609	3,790
Skdh	19	12,325	- 0,542	3,615
Got	0	5,000	1,000	5,00
Est	8	10,475	0,236	0,585
Gludh	17	13,075	- 0,300	1,178
Idh	17	11,700	- 0,453	2,401
Adh	19	11,175	- 0,700	5,479
Cat-1	9	11,175	0,195	0,423
Cat-2	3	10,800	0,722	5,633

P < 0,05 e ns = não significativo

Tabela 9 – Heterozigosidade observada e esperada ( $H_o$  e  $H_e$ ), índices de fixação de Wright ( $f$ ) e teste  $\chi^2$  para os locos da população REF.

Locos	Heterozigose observada	Heterozigose esperada	Índice de fixação (F)	$\chi^2$
Po-1	0	3,579	1,000	3,579
Po-2	0	3,143	1,000	3,143
Skdh	0	5,714	1,000	5,714
Est	6	5,100	- 0,176	0,159
Gludh	2	4,800	0,583	1,633
Acp-1	1	0,944	- 0,059	0,003
Idh	0	5,053	1,000	5,053
Adh	2	1,917	- 0,043	0,003
Cat-1	1	9,375	0,893	7,462
Cat-2	0	3,429	1,000	3,429

P < 0,05 e ns = não significativo



Tabela 10 – Heterozigosidade observada e esperada ( $H_o$  e  $H_e$ ), índices de fixação de Wright ( $f$ ) e teste  $\chi^2$  para os locos da população TOR.

Locos	Heterozigose observada	Heterozigose esperada	Índice de fixação (F)	$\chi^2$
Po-1	0	1,900	1,000	1,900
Po-2	0	8,100	1,000	8,100
Skdh	2	6,588	0,696	3,195
Est	0	9,263	1,000	9,263
Gludh	2	1,882	- 0,062	0,007
Acp-1	3	2,735	- 0,097	0,025
Acp-2	6	6,462	0,071	0,033
Adh	19	9,975	- 0,905	8,165
Cat-1	0	3,600	1,000	3,600
Cat-2	0	3,429	1,000	3,429

P < 0,05 e ns = não significativo

#### 4.3 - Estatística F de Wright

Na Tabela 12 são apresentados os resultados obtidos para variabilidade entre e dentro das populações de *C. echinata*. Foram estimados os valores de diversidade intrapopulacional ( $F_{IS}$ ), diversidade total ( $F_{IT}$ ) e diversidade interpopulacional ( $F_{ST}$ ), conforme Wright (1965).

Observa-se que a diversidade dentro de populações para os locos estudados variou de -0,728, para o alelo Adh, a 1,000, para o loco Got, tendo uma média de 0,305. O índice de diversidade total teve variação de -0,098, para o loco Adh, a 1,000, para o loco Got, tendo média de 0,453 e a diversidade entre as populações variou de 0,029, para o alelo Acp-1, a 0,364, para o alelo Adh, tendo média geral de 0,212.

Os valores médios obtidos para esse parâmetro mostram que a diversidade entre as populações é superior à diversidade dentro das populações, 0,305 e 0,212, respectivamente. Isto provavelmente seja decorrente da baixa densidade populacional nas populações naturais que proporcionam uma distância entre os indivíduos que dificulta o fluxo gênico entre os mesmos. Como as duas populações naturais ocorrem na mesma região, distante a 6 km, provavelmente ambas tiveram origem similar e não houve tempo suficiente para que houvesse maior diversidade entre elas. Por outro lado, deve-se considerar que a população REF pode ter sido oriunda de CAM, há cerca de 35

anos, sendo estas populações, portanto, próximas, o que contribui para baixar o valor da diversidade entre populações.

Tabela 12 – Resumo das estatísticas F de Wright em doze locos, de três populações de *C. echinata*, na Estação Ecológica do Tapacurá-PE, em relação à diversidade dentro ( $F_{IS}$ ), total ( $F_{IT}$ ) e entre ( $F_{ST}$ ) populações.

Loco	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
Po-1	0,034 <sup>ns</sup>	0,258 <sup>**</sup>	0,283 <sup>**</sup>
Po-2	0,854 <sup>**</sup>	0,230 <sup>**</sup>	0,887 <sup>**</sup>
Skdh	0,244 <sup>ns</sup>	0,255 <sup>**</sup>	0,437 <sup>**</sup>
Got	1,000 <sup>**</sup>	0,118 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>**</sup>
Est	0,408 <sup>ns</sup>	0,060 <sup>ns</sup>	0,443 <sup>**</sup>
Gludh	0,062 <sup>ns</sup>	0,271 <sup>**</sup>	0,316 <sup>**</sup>
Acp-1	-0,082 <sup>ns</sup>	0,029 <sup>ns</sup>	-0,050 <sup>ns</sup>
Acp-2	0,071 <sup>ns</sup>	0,364 <sup>**</sup>	0,409 <sup>**</sup>
Idh	0,001 <sup>ns</sup>	0,162 <sup>**</sup>	0,163 <sup>ns</sup>
Adh	-0,728 <sup>**</sup>	0,364 <sup>**</sup>	-0,098 <sup>ns</sup>
Cat-1	0,586 <sup>**</sup>	0,097 <sup>**</sup>	0,626 <sup>**</sup>
Cat-2	0,901 <sup>**</sup>	0,113 <sup>**</sup>	0,912 <sup>**</sup>
Média	0,305	0,212	0,453

\*\*P < 0,05; ns = não significativo

#### 4.4 - Distâncias genéticas entre populações

Com relação à similaridade entre as populações estudadas, verifica-se que CAM e REF são as mais similares com 0,179 e em relação a TOR 0,286. Estes valores concordam com o histórico das duas populações, já que CAM por ser mais próximo da sede da EET foi utilizada para coletar sementes para produção de mudas que deram origem aos bosques de reflorestamento (REF) no início década de 1970.

A população CAM e TOR apresenta 0,75 de similaridade este valor pode ser considerado baixo em se tratando de populações, de uma mesma espécie. Portanto, a distância genética de 0,28 entre as duas populações mostra a necessidade de conservação de ambas já que as mesmas apresentam identidades própria.



Tabela 13 – Matriz de similaridades (acima da diagonal) e distâncias genéticas (abaixo da diagonal) não-enviesadas de Nei (1978) nas três populações de *C. echinata*, na Estação Ecológica do Tapacurá.

Populações	1 - CAM	2 - REF	3 - TOR
1 - CAM	****	0,858	0,751
2 - REF	0,154	****	0,836
3 - TOR	0,286	0,179	****

A alta divergência entre as duas populações naturais também sugere que ambas tenham passado pelo efeito de deriva genética, seja de fundador (menos provável por serem populações naturais) ou mais provável, pelo efeito de estrangulamento também denominado efeito do gargalo de garrafa. Tais eventos podem ter dado as características próprias observadas entre as duas populações naturais.

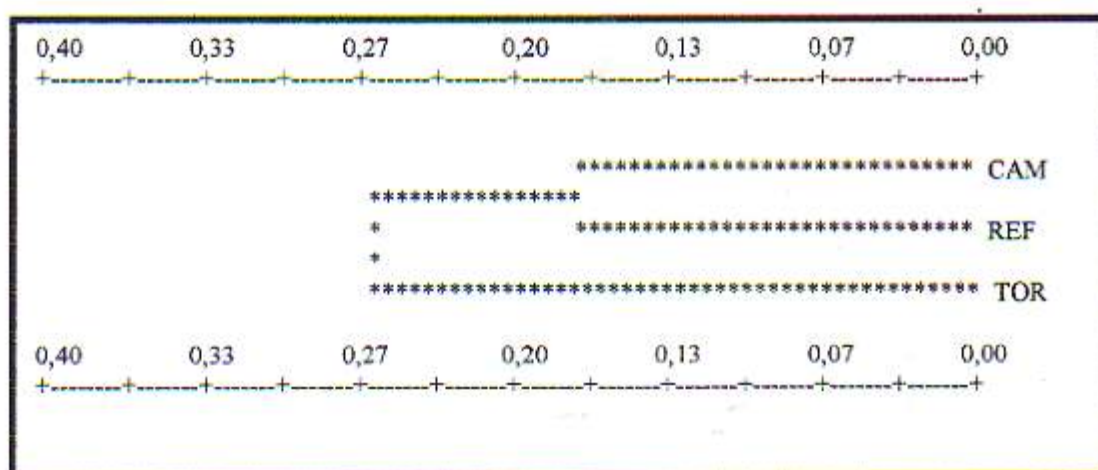


Figura 7 – Dendrograma das distâncias genéticas não enviesadas de Nei (1978) das três populações de *C. echinata*, pelo método UPGMA.

A distância genética observada entre CAM e TOR (0,28) pode ser justificada por essas populações naturais estarem isoladas e distantes aproximadamente 6 km, e provavelmente, sob diferentes efeitos seletivos ou sob deriva genética.

Assim sendo, há cerca de 20 anos, vêm sendo produzidas e distribuídas mudas de pau-brasil com sementes provenientes de REF com pouca representatividade de CAM e sem nenhuma representatividade de TOR. Nesse contexto, como há interesse na

produção de mudas, é recomendável que sejam coletadas sementes das populações CAM e TOR, buscando também representatividade dentro dessas referidas populações.



## 5 – CONCLUSÕES

Existe um nível razoável de variabilidade genética tanto nas duas populações naturais (CAM e TOR), como na população de reflorestamento (REF).

As populações TOR e REF apresentam altos índices de fixação alélica, estando, portanto, fortemente afetadas pela endogamia ou seleção contra o heterozigoto. Esses resultados apesar de esperado para REF, devido sua origem, alerta para os risco de erosão genética em TOR.

Das três populações com potencial para coleta de sementes visando a produção de mudas (CAM, TOR e REF), REF é a menos indicada por apresentar maior taxa de homozigose e maior índice de fixação alélica.

Já que a diversidade genética intrapopulacional foi maior do que a diversidade interpopulacional, mas ambas existem, em programa de produção de mudas, deve-se realizar coleta sementes representativa das duas populações naturais, para representar a variabilidade existente nas populações.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, F. F. A.; AOKI, H. Regiões de ocorrência natural do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam) In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., 1982., Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1983. p. 1-5.

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa, MG: SIF, 1991. 242 p.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381 p.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, Belfast, v. 52, p.145-157, 1978.

BROWN, A. H. D.; WEIR, B. S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. L. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding.** Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. p. 219-239.

BROWN, A. H. D.; MORAN, G. F. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: CONCKLE, M. T. **Isozymes of North American forest insects.** Berkeley: U.S. Department Agriculture, 1981. p. 1-10.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 640p.

COSTA, J. P. Pau Brasil: um pouco da sua história. **Pau Brasil**, ano 1, n. 1, p. 9-12, 1984.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa.** Viçosa, MG: UFV, 1989. 279 p.



FERREIRA, M. E. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.

GUSSON, E. **Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (*Eschweillera ovata* [Cambess.] Miers): subsidio ao manejo e conservação da espécie**. 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and Conservation**. Menlo Parck: The Benjamin / Cummings Publishing Company, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozymediversity in plant species. In: BROWN, A. H. D. et al. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 145-162.

HUANG, Q. Q. *et al.* Genetic control of isozyme variation in Masson Pine, *Pinus massoniana* Lamb. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 285-292, 1994.

INSTITUTO PAU-BRASIL, Disponível em:

<<http://www.institutopaubrasil.org.br/paubrasil/paubrasil3.htm>>. Acesso em: 05 de jul. de 2004.

LACERDA, C. M. B. **Diversidade genética por isoenzimas em populações naturais de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Freire F.; M. F. Allemão) Anacardiaceae no semi-árido**. 1997. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LI, C. C.; HORVITZ, D. G. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **American Journal of Humman Genetics**, Chicago, v. 5, n., p.107-117, 1953.

LIMA, H. C. Taxonomia e distribuição geográfica atual de *caesalpinia echinata* lam. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Disponível em: <<http://www.hlimajbrj.gov.br>. Acessado em: 05 jul. de 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.

LOISELLE, B. A.; SORKY, J. N.; GRAHAM, C. Spacial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotia officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 11, p. 1420-25, 1995

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

MELO, S. C. O.; CUPERTINO, F. B.; CORRÊA, R. X. Variação genética e conservação de pau-brasil com base em marcadores moleculares. In: SIMPÓSIO DO PAU-BRASIL Disponível em: <[http://www.botanicasp.org.br/pau\\_brasil/palestras/03.htm](http://www.botanicasp.org.br/pau_brasil/palestras/03.htm)> Acessado em: 28 ago. 2003.

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**. 1992. 139 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MORAES, P. L. R. **Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees e Martius Ex Ness (Lauraceae)**. 1997. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MORAN, G. F.; HOPPER, S. D. Conservation of the genetic resources of rare and widespread eucalypts in remnant vegetation. In: SAUNDERS, D. A.; et al. **Nature**



**Conservation: the role of remnants of native vegetation.** Surrey: Beaty and Sons, 1987. 410 p.

MUONA, O. Population genetics in forest tree improvement. In: BROWN, A. H. D.; et al. **Plant Population Genetics breeding and genetic resources.** Sunderland: Sinauer Associates, 1989. p. 282-298.

MURAWSKI, D. A.; BAWA, K. S. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Srilank **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 2, p.155-160, 1994.

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

OLIVEIRA, V. R. de. **Diversidade genética em populações de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC.) na região Semi-árida do Nordeste Brasileiro.** 1999. 194 f. Tese (Doutorado em Melhoramento Vegetal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PINTO, L. R.; SOUZA, A. P. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, Brasília, n. 20, p. 16-19, 2001

REIS, M. S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius).** 1996. 210 f. Tese (Doutorado em Melhoramento Vegetal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ROBINSON, I. P. Aloenzima 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. cap. 7, p. 329-380

RONDON, J.; FIGUEIREDO, R. R. C. L.; ZAIDAN, L. B. P. Efeito do fotoperíodo no desenvolvimento de *Caesalpinia echinata* LAM. (Pau-brasil) Leguminosae. In: **SIMPÓSIO DO PAU-BRASIL**. Disponível em: <[http://www.botanicasp.org.br/pau\\_brasil/palestras/03.htm](http://www.botanicasp.org.br/pau_brasil/palestras/03.htm)> Acesso em 28 ago. 2003.

SANTOS, E. M. G. **Ecologia de polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae)**. 1994. 114 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SHAW, D. V.; ALLARD, R. W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-Fir using isozyme markers. **Theoretical Application Genetic**, Belfast, v.62, p. 113-120, 1982.

SOARES, C. M. C. **Pau-brasil: a árvore nacional**. 2. Ed. – Recife: UFRPE, 1985. 39p.

SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. A fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. **Journal of Heredity**, Washington, v. 72, p. 281-283, 1981.

SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. **Biosys-1**. A computer program analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1,7. Champaign: Illinois Natural History Survey, 1989. 43p.

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

WEIR, B. S.; BASTEN, C. J. Sampling strategies for DNA sequence distance. **Biometrics**, Washington, v. 26, p. 551-582, 1990.

WORKMORE, P. L.; NISWANDER, J. D. Population studies on southwestern indian tribes. II. Local genetic differentiation in the papago. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 22, p. 24-49, 1970.



WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 323-354, 1951.

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