

Diversidade genética de uma população “*ex situ*” de *Caesalpinia echinata* Lam.

Genetic diversity of “*ex situ*” population of *Caesalpinia echinata* Lam

João Del Giudice Neto
Alexandre Magno Sebbenn
Paulo Yoshio Kageyama

RESUMO: Os objetivos deste trabalho foram avaliar o nível de variabilidade e estrutura genética presentes em uma população de *Caesalpinia echinata* Lam (pau-brasil) implantada em arboreto, localizado no Estado de São Paulo. Estimaram-se a diversidade genética, a endogamia e o coeficiente de parentesco usando marcadores isoenzimáticos. Analisaram-se duas gerações, árvores adultas e suas progênes. *C. echinata* no arboreto apresenta um nível alto de diversidade genética comparado a outras espécies arbóreas tropicais, com média de 2,00 a 2,27 alelos por loco (\bar{A}), 66,7% de locos polimórficos ($\hat{P}_{95\%}$), 0,248 a 0,291 de heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e 0,298 a 0,321 de heterozigosidade esperada (\hat{H}_e). O índice de fixação de Wright (\hat{f}) foi maior nas árvores adultas comparado às progênes (0,169 e 0,095). O menor índice de fixação nas progênes foi atribuído à seleção contra homozigotos. Nas árvores adultas o coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) médio foi de 0,168. Os altos níveis de endogamia e coancestria observados nas árvores adultas do arboreto podem ser atribuídos aos efeitos da deriva genética gerada pelo processo de fundação da população.

PALAVRAS-CHAVE: *Caesalpinia echinata*, Espécies arbóreas tropicais, Pau-brasil, Diversidade genética, Coancestria

ABSTRACT: The purposes of this research were to assess the level of variation and genetic structure of “*ex situ*” *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) population, located in State of São Paulo, Brazil. The genetic diversity, inbreeding and coancestry coefficient were estimated by isozyme markers. Two generations were used in the analysis, adult trees and their progenies. *C. echinata* in the arboretum shows high level of genetic diversity compared to other tropical tree species, with 2.00 to 2.27 average number of alleles per locus (\bar{A}), 66.7% of polymorphic loci ($\hat{P}_{95\%}$), 0.248 to 0.291 of observed heterozygosity (\hat{H}_o) and 0.298 to 0.321 of expected heterozygosity (\hat{H}_e). Wright's fixation index (\hat{f}) was higher in adult trees than in the correspondent families (0.169 and 0.095). Selection against homozygous trees was argued the cause of lower Wright's fixation index in the progenies. In adult trees the average coancestry coefficient ($\hat{\theta}_{xy}$) was 0.168. The high levels of inbreeding and coancestry detected in adult trees of the arboretum may be imputed to genetic drift in the foundation population process.

KEYWORDS: *Caesalpinia echinata*, Tropical tree species, Brazilwood, Genetic diversity, Kinship.

INTRODUÇÃO

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) (Leguminosae – Caesalpinioideae) é uma espécie arbórea endêmica brasileira típica da floresta ombrófila densa que ocorre na região que vai do Estado do Rio Grande do Norte (05°45'S) ao Rio de Janeiro (23°S) (CARVALHO, 1994). Essa foi a pri-

meira espécie arbórea brasileira a ser explorada comercialmente em larga escala. Sua exploração teve grande importância econômica para o país no início da colonização, especialmente pela presença de corantes em sua madeira, que eram usados para a fabricação de tinta para roupas. Contudo, seu potencial de uso é ainda maior, incluindo a

produção de madeira serrada, energia, tintura, corante, uso ornamental, fabricação de instrumentos musicais e potencial para reflorestamentos ambientais (CARVALHO, 1994). No entanto, sua intensiva e desordenada exploração iniciada logo após a ocupação da costa brasileira pelos colonizadores portugueses reduziu sua distribuição a pequenos remanescentes na atualidade (MELLO FILHO, 1991/1992; CARDOSO *et al.*, 1998). Por este motivo, hoje a espécie encontra-se em alto risco de extinção (BRASIL, 1992), sobrando apenas pequenas populações remanescentes isoladas. Medidas para a sua conservação, portanto, devem ser adotadas imediatamente.

A efetiva conservação genética de uma espécie requer o prévio conhecimento de seu sistema de reprodução, estrutura e diversidade genética. Estes conhecimentos permitem o delineamento de estratégias para a recombinação, amostragem e uso do material genético remanescente. Tais informações podem ser obtidas por meio do uso de marcadores genéticos, como as isoenzimas. No caso de espécies arbóreas, programas de conservação têm procurado dar ênfase à determinação dos níveis de variabilidade genética mantidos dentro e entre populações naturais, como forma de planejar o uso sustentável e a conservação *in situ*. Este tipo de conservação é considerado ideal para as espécies arbóreas tropicais, contudo, não é o único. Não há hierarquia entre as formas de conservação *in situ* e *ex situ*. Há algumas situações em que a conservação *ex situ* é essencial e complementar à *in situ*. A situação mais flagrante dessa complementação é a que se refere às espécies raras em risco de extinção (KAGEYAMA, 1987).

O Instituto de Botânica do Estado de São Paulo possui uma coleção de pau-brasil disposta em arboreto. Além do aspecto conservacionista, essa coleção serve a múltiplas pesquisas e como fornecedora de sementes e mudas. Não há registro sobre a variabilidade genética dessa coleção. Assim, os objetivos deste trabalho foram: avaliar o nível de variabilidade e a estrutura genética presentes na coleção, com vistas à sua conservação *ex situ*, manejo e uso para a produção de sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no arboreto experimental de pau-brasil (22°15'02,4"S e 47°09'28,9"W; altitude média 650 m) implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (22°14,8'-15,6' S e 47°8,8'-

11,6' W, altitude média de 640 m), no município de Mogi Guaçu. A área total do arboreto é de 3.000 m², aproximadamente, tendo sido implantado, em dezembro de 1980, a partir de mudas originadas de sementes provenientes da Estação Ecológica de Tapacurá, Estado de Pernambuco, dentro da zona de ocorrência natural da espécie (AGUIAR, 1992). O número de árvores matrizes que deu origem às sementes utilizadas no plantio do arboreto é desconhecido. Inicialmente, sua implantação visava testar o efeito de diferentes espaçamentos sobre os parâmetros dendrométricos da espécie. Mas, devido ao quadro alarmante de erosão genética em que a espécie se encontra, esse arboreto passou a ser visto como uma importante fonte potencial para a expansão e uso da sua variabilidade genética. Atualmente, o arboreto tem 262 árvores com altura média de doze metros e diâmetro à altura do peito (DAP) em torno de 17 cm.

Duas gerações da espécie foram analisadas, árvores adultas e suas progênes de polinização livre. Trinta e uma árvores adultas foram amostradas. Dessas também foram coletadas sementes, as quais foram postas para germinar em novembro de 1999, separadamente por árvore matriz de origem. O substrato utilizado foi uma mistura igual de terra vegetal, vermiculita e acícula de pinus peneirada. Tubetes, com capacidade de 100 cm³, foram utilizados como recipientes. As mudas foram mantidas nesse tipo de recipiente durante toda a fase de estudo, recebendo, entretanto, adubação mineral de manutenção, a cada sete dias aproximadamente. Alternava-se a aplicação de nitrogênio (2 mg de N.muda⁻¹) e potássio (3 mg de K₂O.muda⁻¹).

Em janeiro de 2002 foram coletadas folhas jovens das 31 árvores adultas e as do terceiro par ou superior de dez plântulas (progênes) de 27 dessas árvores. O período de coletas foi na parte da manhã, em dias chuvosos ou na ausência de sol, proporcionados pela época do ano. As amostras, depois de identificadas e acondicionadas em sacos de papel Kraft, foram armazenadas em geladeira a 5 °C por aproximadamente 24 horas, sendo então transportadas ao laboratório, onde foram submetidas às técnicas de eletroforese de isoenzimas, segundo as recomendações descritas em Soltis e Soltis (1989), Kephart (1990) e Alfenas (1998). As corridas de eletroforese foram conduzidas em meio suporte de gel de amido a 13% (34,29 g de penetrose 30 e 18,29 g de amido de milho para 400 ml de tampão) mais sacarose (12,00 g). A solução de extração utilizada foi a nº 1 de Alfenas (1998) e o sistema de cuba e gel

foi o Tris-Citrato (ácido cítrico 0,086 M mais Tris 0,223 M) pH 7,5. As sessões duravam em média quatro horas com uma intensidade elétrica constante de 80 miliamperes. Dezoito locos puderam ser interpretados em onze sistemas enzimáticos previamente selecionados (LAP – E.C. 3.4.11.1; EST – E.C. 3.1.1.1; ACP – E.C. 3.1.3.2; MDH – E.C. 1.1.1.37, três locos; 6PGDH – E.C. 1.1.1.44, dois locos; DIA – E.C. 1.8.1.4; PGI – E.C. 5.3.1.9, dois locos; G6PDH – E.C. 1.1.1.49; GOT – E.C. 2.6.1.1.; PRX – E.C. 1.11.1.7, quatro locos e SKDH - E.C. 1.1.1.25). Prévio estudo da herança e equilíbrio de ligação (GIUDICE NETO et al., 2004) indicou que os locos *Pgi-2*, *Prx-2* e *Prx-4* não segregaram de forma mendeliana e, por isso, foram excluídos da análise.

A diversidade genética intrapopulacional foi caracterizada pela heterozigiosidade observada (\hat{H}_o), diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e), número médio de alelos por loco (\hat{A}) e a porcentagem de locos polimórficos ($\hat{P}_{0,5\%}$), usando-se o programa BIOSYS-2 (SWOFFORD e SELANDER, 1997). Como a amostra incluía duas gerações, aproveitou-se para testar a aderência das frequências gênicas ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), usando o teste exato de Fisher. O coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) entre as árvores adultas e seu respectivo erro padrão foi estimado segundo método descrito por Ritland (1996), utilizando o programa SPAGeDI 1.1 (HARDY e VEKEMANS, 2002). O coeficiente de coancestria nas progênies foi estimado por meio do coeficiente de parentesco calculado de parâmetros do sistema de reprodução em *C. echinata* (GIUDICE NETO et al., 2005) usando o método descrito por Ritland (1989).

Adicionalmente, comparou-se a geração adulta e suas progênies em termos de estatísticas F de Wright (1965) usando a análise de variância de frequências gênicas (WEIR e COCKERHAM, 1984). Essa análise também foi usada para estimar a divergência genética ($\hat{\beta}$) entre a geração adulta e suas progênies. O teste de significância estatística para essas estimativas foi obtido pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade calculado por meio de reamostragens bootstrap. Foram utilizadas 10.000 reamostragens sobre locos. As análises de variância (ANAVA) e os bootstrap foram obtidos com auxílio do programa GDA de Lewis e Zaykin (2002).

O tamanho efetivo populacional foi calculado para adultos e plântulas. Para árvores adultas foi estimado o tamanho efetivo de variância, pela expressão

$$\hat{N}_e = \frac{0,5n^2}{(1+\hat{F})(0,5n \sum_{x=1}^n \sum_{y \neq 1}^n \hat{\theta}_{xy})}$$

derivada por Sebbenn e Seoane (2005), em que \hat{N}_e é o tamanho efetivo, n é o número de indivíduos amostrados, \hat{F} é o coeficiente de endogamia médio populacional e $\hat{\theta}_{xy}$ é o coeficiente de coancestria entre os indivíduos x e y totalizado entre os $[n(n-1)]$ pares de indivíduos. Para as progênies foi estimado o tamanho efetivo de variância descrito em Sebbenn (2002), pela expressão

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0,5}{\hat{\theta}_{xy} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1 + \hat{F}_p}{2n}}$$

em que n é o número total de progênies na população, assumido como infinito, \hat{F}_p é o coeficiente de endogamia do conjunto de progênies e $\hat{\theta}_{xy}$ é o coeficiente de coancestria entre plantas dentro de progênies.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os quinze locos analisados, dez foram polimórficos tanto nas árvores adultas quanto nas progênies. Há, para a maioria dos locos, uma concordância entre as frequências alélicas das árvores adultas e das progênies (Tabela 1).

Existem, nas progênies, locos em que ocorre a presença de alelomorfos em frequência muito baixa. Por exemplo, o alelo 2 do loco *Mdh-2*, os alelos 2 e 3 do loco *6Pgdh-1* e o alelo 2 do loco *6Pgdh-1* ocorreram apenas nas progênies. Não obstante a aparente concordância entre as frequências alélicas dos adultos e das progênies, o teste exato de Fisher apontou desvios do modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg em um loco nas árvores adultas (*Est-3*) e em dez locos (*AcP-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1* e *6Pgdh-2*) nas progênies. No loco *Est-3*, a causa dos desvios observados, em ambas as populações, foi o excesso de homozigotos (Tabela 2). Nas progênies, os desvios nos locos *Lap-1*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1* e *6pgdh-2* foram motivados pelo excesso de homozigotos e nos demais locos, devido ao excesso de heterozigotos (Tabela 2). A estimativa da divergência genética ($\hat{\beta}$) entre as frequências alélicas das árvores adultas e das progênies foi baixa e variou entre locos de -0,009 a 0,106, com média de 0,010 (Tabela 1). O intervalo de confiança a 95% de probabilidade da média da divergência entre populações (-0,004 a 0,033) mostrou que esta não é estatisticamente diferente de zero.

Tabela 1.

Freqüências alélicas, probabilidades do teste exato de Fisher para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e divergência genética ($\hat{\theta}$) entre árvores adultas e progênies de *Caesalpinia echinata* Lam, implantada em arboreto. N é o tamanho da amostra.

(Allele frequencies, Fisher exact test probabilities for Hardy-Weinberg equilibrium and genetic divergence ($\hat{\theta}$) between adult trees and families of *Caesalpinia echinata* Lam, implanted in arboretum. N is the sample size)

Loco	Alelo	Adultos	PFisher	Progênies	PFisher	$\hat{\theta}$
<i>Acp-1</i>	1	0,267		0,172		
	2	0,733		0,828		
	N	30	1,000	218	0,008	0,020
<i>Dia-1</i>	1	0,017		0,002		
	2	0,683		0,571		
	3	0,3		0,427		
	N	30	0,201	211	0,000	0,020
<i>Est-3</i>	1	0,583		0,563		
	2	0,417		0,438		
	N	30	0,000	208	0,000	-0,009
<i>Got-1</i>	1	1		1		
	N	31	---	233	---	---
<i>G6pdh-1</i>	1	1		0,991		
	2	0		0,009		
	N	31	---	213	1,000	-0,004
<i>Lap-1</i>	1	0,645		0,671		
	2	0,355		0,329		
	N	31	0,437	117	0,000	-0,009
<i>Mdh-1</i>	1	0,065		0,283		
	2	0,935		0,717		
	N	31	1,000	233	0,000	0,106
<i>Mdh-2</i>	1	1		0,998		
	2	0		0,002		
	N	31	---	233	1,000	-0,008
<i>Mdh-3</i>	1	0,032		0,035		
	2	0,355		0,315		
	3	0,613		0,65		
	N	31	0,070	227	0,000	-0,006
<i>Pgi-1</i>	1	1		1		
	N	31	---	232	---	---
<i>Prx-1</i>	1	0,389		0,374		
	2	0,407		0,359		
	3	0,204		0,267		
	N	27	0,244	131	0,000	-0,006
<i>Prx-3</i>	1	0,448		0,34		
	2	0,241		0,288		
	3	0,31	0,454	0,372	0,044	0,003
	N	29		191		
<i>Skdh-1</i>	1	0,926		0,834		
	2	0,074		0,166		
	N	27	1,000	169	0,000	0,021
<i>6pgdh-1</i>	1	1		0,989		
	2	0		0,009		
	3	0		0,002		
	N	31	---	233	1,000	-0,004
<i>6pgdh-2</i>	1	0,081		0,08		
	2	0,452		0,452		
	3	0,468		0,467		
	N	31	0,147	230	0,000	-0,009
<i>Média</i>						0,010ns

ns: Não significativo a partir do intervalo de confiança a 95% de probabilidade, estimado com base em 10.000 reamostragens bootstrap. (ns: not significant at 95% of confidence level, estimated by 10.000 bootstrap)

Tabela 2.

Estimativas do índice de fixação de Wright (\hat{f}), teste de qui-quadrado (χ^2) e probabilidade associada (P) em árvores adultas e progênes de *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto. (Wright's fixation index estimates (\hat{f}), chi-square test (χ^2) and associated probability (P) in adult trees and families of *Caesalpinia echinata* Lam. implanted in arboretum)

Locos	Adultos			Progênes		
	\hat{f}	χ^2	P	\hat{f}	χ^2	P
Acp-1	-0,023	0,02	0,901	-0,176	6,72	0,010
Dia-1	-0,280	2,62	0,105	-0,416	37,09	0,000
Est-3	0,794	18,93	0,000	0,336	23,45	0,000
G6pdh-1	---	---	---	-0,009	0,02	0,890
Lap-1	0,155	0,74	0,3895	0,516	31,16	0,000
Mdh-1	-0,069	0,15	0,701	-0,353	29,02	0,000
Mdh-2	---	---	---	-0,002	0,00	0,974
Mdh-3	-0,362	4,89	0,027	-0,384	41,39	0,000
Prx-1	0,307	4,81	0,028	0,572	84,70	0,000
Prx-3	0,251	3,55	0,060	0,068	1,77	0,183
Skdh-1	-0,080	0,17	0,678	0,358	21,65	0,000
6pgdh-1	---	---	---	-0,009	0,03	0,873
6pgdh-2	0,322	4,68	0,031	0,192	12,39	0,000

Tabela 3.

Índices de diversidade em quinze locos enzimáticos de árvores adultas e suas progênes de *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto. n : tamanho médio da amostra; $\hat{P}_{95\%}$: porcentagem de locos polimórficos; \hat{A} : número médio de alelos por loco; \hat{H}_o : heterozigosidade observada; \hat{H}_e : diversidade gênica esperada em EHW; \hat{f} : índice de fixação; $\hat{\theta}_{xy}$: coeficiente de coancestria; N_e : tamanho efetivo populacional.

(Diversity indexes for fifteen enzymatic loci of adult trees and their families of *Caesalpinia echinata* Lam. implanted in arboretum. n : average sample size; $\hat{P}_{95\%}$: percentage of polymorphic loci; \hat{A} : average number of alleles per locus; \hat{H}_o : observed heterozygosity; \hat{H}_e : expected heterozygosity; \hat{f} : fixation index; $\hat{\theta}_{xy}$: coancestry coefficient; N_e : effective population size)

Estimativas	Adultos	Progênes
n	30,1 (0,4)	205,3 (9,7)
$\hat{P}_{95\%}$	66,7%	66,7%
\hat{A}	2,00 (0,22)	2,27 (0,18)
\hat{H}_o	0,248 (0,062)	0,291 (0,066)
\hat{H}_e	0,298 (0,068)	0,321 (0,065)
\hat{f}	0,169 ns	0,095 ns
$\hat{\theta}_{xy}$	0,168 (0,130)	0,269
\hat{N}_e	7,30	1,86a
\hat{N}_e/n	0,24	0,19

a: Tamanho efetivo de variância de uma simples progênie (variance effective size of a single family)
 ns: não significativo (ns: not significant)
 Os números entre parênteses representam o erro-padrão da média (numbers between parenthesis are standard error).

A estimativa dos índices de diversidade genética indicou, em geral, maiores níveis de variabilidade na geração das progênes em comparação à geração adulta (Tabela 3). A porcentagem de locos polimórficos ($\hat{P}_{95\%}$) foi de 66,7% nos adultos e nas progênes, o número médio de alelos por loco (\hat{A}) detectado nos adultos foi 2,00 e nas progênes de 2,27. A diversidade gênica (\hat{H}_e) foi para adultos de 0,298 e para progênes de 0,321. A heterozigosidade média observada \hat{H}_o foi de 0,248 para adultos e 0,291 para progênes.

Os níveis de diversidade genética detectados nas árvores adultas e progênes de pau-brasil estão acima dos observados em outras espécies arbóreas tropicais. Loveless e Hamrick (1987) reportam para a média das espécies arbóreas tropicais valores médios para as estimativas \hat{A} e \hat{H}_e de 2,02 e 0,240, respectivamente. A comparação dos níveis de diversidade genética detectados em pau-brasil com os encontrados em outras espécies tropicais, com ampla distribuição geográfica, pertencentes a grupos ecológicos semelhantes e que são dominantes do dossel, indicou diferenças ainda maiores. Em *Genipa americana* L. os valores máximos de \hat{A} , \hat{H}_o e \hat{H}_e foram de 1,63, 0,195 e 0,182 (SEBENN et al., 1998). Em *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão essas estimativas foram de 1,5, 0,121 e 0,093 (LACERDA et al., 1999). Há, entretanto, espécies que apresentam índices de diversidade maiores do que o observado em pau-brasil. É o caso, por exemplo, de *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer em que os valores estimados foram 2,36, 3,60 e 0,358 (KAGEYAMA

et al., 2003), embora as estimativas obtidas para essa espécie bem como para o pau-brasil sejam consideradas altas.

Segundo Wright (1931), quando o tamanho populacional é subitamente reduzido, é esperado um declínio da heterozigosidade média por loco. De imediato, entretanto, não há mudanças na variabilidade genética. O grau de heterozigosidade e, portanto, a variância genética, é quase tão alto quanto o da população de onde vieram os colonizadores (FUTUYMA, 1992). Isto ocorre, prossegue o autor, simplesmente porque os alelos raros pouco contribuem para o nível de heterozigosidade da população originada e são esses mesmos alelos que provavelmente estarão ausentes da colônia. Se a colônia permanecer pequena, a heterozigosidade diminuirá rapidamente por deriva genética e apenas lentamente haverá sua recomposição por mutação e deriva, a menos que a seleção natural aumente a frequência dos alelos raros (NEI *et al.*, 1975). Porém, os resultados obtidos, principalmente nas progênies, mostram que a população retém alguns alelos raros, que se não foram originados por mutação, fato pouco provável, provieram de indivíduos adultos do arboreto, não amostrados neste estudo.

Não há conhecimento sobre a variabilidade genética da população ancestral, contudo, os níveis de diversidade obtidos neste estudo estão a sugerir que ela mantém uma alta variabilidade genética. Esse dado é importante porque devido à superexploração da espécie e à fragmentação do hábitat natural muitas de suas populações desapareceram. Há evidências de que *C. echinata* tem sobrevivido apenas em manchas de solo mais seco separadas por trechos de florestas mais úmidas. Cardoso *et al.* (1998) realizaram um estudo sobre a variação genética em populações naturais de *C. echinata*. Embora os dados não possam ser comparados devido ao método utilizado por estes autores (RAPD), seus dados revelam um extenso polimorfismo, evidenciando uma alta variação. Existe, contudo, um considerável nível de diferenciação genética entre as populações (LIRA *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2005), contrariando as expectativas de retenção da maior parte da variação dentro de populações, como é o caso de espécies alógamas, lenhosas e de ciclo longo, como o pau-brasil. A divergência genética observada pode sugerir que a espécie tolere algum grau de endogamia (CARDOSO *et al.*, 1998).

O índice de fixação (\hat{f}) foi maior nas árvores adultas (0,169) relativamente às progênies

(0,095), embora ambos não sejam estatisticamente diferentes de zero. O coeficiente médio de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) estimado nas árvores adultas foi de 0,168, valor superior ao esperado entre indivíduos meios-irmãos (0,125) (Tabela 3). Contudo, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% dessa estimativa (1,96.erro padrão = 0,255) verifica-se que ela não é significativamente diferente de zero. A Figura 1 mostra a distribuição de classes de parentescos estimadas entre pares de indivíduos no arboreto. As estimativas variaram de -0,375 a 0,617. Um total de 56,7% das estimativas foram negativas ou nulas e 43,3% foram positivas. Valores negativos indicam ausência de qualquer grau de parentesco entre os indivíduos. Já a estimativa do coeficiente de coancestria médio dentro de progênies foi de 0,269, valor este próximo ao esperado em progênies de irmãos-completos. Acredita-se que a presente população de pau-brasil tenha sido formada a partir de sementes coletadas de poucos indivíduos. Esse fato, chamado de efeito fundador, poderia levar à perda de diversidade por deriva genética, devido à restrição do tamanho populacional motivada pelo afinilamento da base genética. Considerando que o coeficiente de endogamia (\hat{f}) em uma geração corresponde ao coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) da geração precedente (LINDGREN *et al.*, 1996), a estimativa do índice de fixação nas árvores adultas sugere que o arboreto foi formado por sementes geradas por cruzamentos entre indivíduos parentes entre o grau de meios-irmãos e irmãos-completos. Em outras palavras, a população que deu origem às progênies encontrava-se estruturada. Adicionalmente, a coancestria entre as árvores amostradas embora não seja estatisticamente significativa, sugere que o arboreto é formado por árvores endogâmicas e aparentadas como meios-irmãos. Isto, por sua vez, indica que a população de origem estava geneticamente estruturada e que as sementes foram coletadas de uma ou poucas árvores.

Ressalta-se que a magnitude do coeficiente de coancestria obtido, embora não significativo, tem importantes implicações biológicas. Ele implica na possibilidade de gerar endogamia de 0,168 nas progênies. Contudo, a estimativa do índice de fixação nas progênies foi menor (0,095) e não significativo. A maior endogamia nas árvores adultas em relação às progênies pode estar associada ao fato de que este arboreto foi implantado em delineamento experimental, ou seja, visando o controle do ambiente. Em condições controladas, a seleção natural pode ser menos efetiva.

Snieszko e Zobel (1988) estudando os efeitos da depressão endogâmica em *Pinus taeda* L. sob condições de viveiro observaram ausência de efeitos da endogamia, atribuindo este resultado às ótimas condições de experimentação, a qual reduzira a pressão de seleção. Isto pode ter acontecido no arboreto de pau-brasil. Por outro lado, a menor endogamia em progênies coletadas em uma população com fortes evidências de endogamia e coancestria pode ser atribuída à seleção contra homozigotos. Como a base genética da população já era restrita, e provavelmente ocorreram cruzamentos entre parentes, os efeitos da endogamia devem ter sido pronunciados, eliminando os indivíduos homozigóticos entre a fase de formação dos zigotos e a caracterização genética das plântulas.

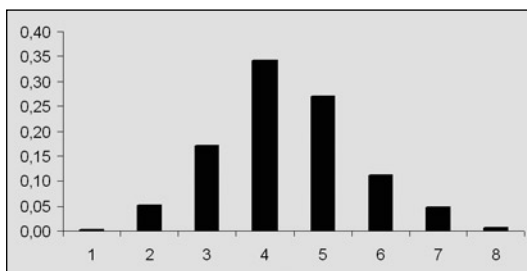


Figura 1.

Distribuição das estimativas de coancestrias (parentesco) entre pares de indivíduos de *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto. Classe 1: < -0,375; Classe 2: -0,375 a -0,250; Classe 3: -0,250 a -0,125; Classe 4: -0,125 a 0; Classe 5: 0 a 0,125; Classe 6: 0,125 a 0,250; Classe 7: 0,250 a 0,500; Classe 8: > 0,500.

(Coancestry estimate distributions among *Caesalpinia echinata* Lam. individuals pairs implanted in arboretum. Class 1: < -0,375; Class 2: -0,375 a -0,250; Class 3: -0,250 a -0,125; Class 4: -0,125 a 0; Class 5: 0 a 0,125; Class 6: 0,125 a 0,250; Class 7: 0,250 a 0,500; Class 8: > 0,500)

A estimativa do tamanho efetivo das árvores adultas foi extremamente baixa, aproximadamente 7, comparativamente ao tamanho amostral (31 árvores), resultando na relação \hat{N}/n de apenas 0,24 (Tabela 3). Multiplicando está relação pelo número de árvores presentes no arboreto (262 árvores) conclui-se que essas árvores correspondem a apenas 63 árvores de uma população panmítica ideal (população de cruzamentos aleatórios, tamanho infinito, sem efeitos de seleção, deriva genética, migração e mutação).

O tamanho efetivo de 50, muito usado em programas de conservação genética e próximo ao observado no arboreto (63), pode reter muitos alelos de uma população no curto prazo (10 gerações), mas não é suficiente para reter alelos raros no longo prazo (100 gerações). Assim, o presente arboreto tem valor como unidade de conservação de *C. echinata* no curto prazo. No entanto, esse tempo pode ser ampliado se a variabilidade genética for distribuída em várias populações isoladas (p.ex., 10 populações), de forma que a perda de variação genética devido ao aumento da coancestria dentro das populações, causada pelo isolamento, possa no futuro ser restituída pelo cruzamento das diversas populações fundadas.

Outra alternativa para incrementar o potencial genético do arboreto é aumentar seu tamanho efetivo com a introdução de novos indivíduos, advindos de outras populações e de um número adequado de árvores de cada população (30 árvores matrizes, SEBBENN, 2002). Estudo recente da estrutura genética de populações de *C. echinata*, em algumas regiões de sua ocorrência, tem revelado grandes diferenças genéticas entre regiões (51,67%) e populações (10,39%) dentro de regiões (CARDOSO et al., 2005), indicando que para a conservação *ex situ* da espécie devem ser incluídas amostras de várias regiões e populações da espécie. Para se conservar um alelo comum, com frequência maior do que 0,05, e de ocorrência localizada, em, no máximo, 25% das populações, a amostra deveria conter sementes de pelo menos 14 populações distribuídas aleatoriamente em toda a distribuição natural da espécie (SEBBENN, 2003).

Para utilizar o arboreto como pomar de sementes para reflorestamentos, o ideal seria submetê-lo a um manejo, procurando reduzir ou eliminar o parentesco interno, e assim, evitar ou minimizar a endogamia nas sementes coletadas. Mas para isso, seria necessário avaliar por marcadores genéticos o genótipo de todas as árvores do arboreto e depois efetuar o corte seletivo de árvores parentes localizadas espacialmente próximas. Pode-se também, na fase de viveiro, eliminar plântulas com indícios de endogamia, como má formação, lento desenvolvimento e doentes.

A coleta de sementes no arboreto deve procurar reter o máximo da variabilidade genética presente. A estimativa do coeficiente de coancestria médio dentro das progênies ($\hat{\theta}_{ij}$) sugere que as progênies coletadas de polinização aberta são

compostas por irmãos-completos. Isso pode ser comprovado pelo tamanho efetivo de variância estimado médio por progênie (1,86) (Tabela 3), que comparativamente ao tamanho amostral de cada progênie (10 plântulas) resulta na relação \hat{N}/n de 0,19. Assim, a variabilidade genética liberada nas sementes é aparentemente 50% menor do que a esperada em grandes populações de cruzamentos aleatórios, devido à maior proporção de alelos idênticos por descendência nas progênies. O número de árvores matrizes (m) necessárias para a coleta de sementes visando reter a variabilidade genética atual do arboreto pode ser estimado da relação entre o tamanho efetivo alvo da amostra, que no caso é de 63, e do tamanho efetivo de variância observado nas sementes, 1,86 (SEBBENN, 2002). Com base nessa relação, seria necessário a coleta de sementes em pelo menos 34 árvores ($\hat{m} = 63/1,86$). Essas árvores devem estar distribuídas aleatoriamente no arboreto.

CONCLUSÕES

O arboreto de *Caesalpinia echinata* de Mogi Guaçu apresenta alto nível de variação genética. O tamanho efetivo dessa população é de 63 indivíduos (relação $\hat{N}/n = 0,24$) tendo, portanto, uma representatividade genética compatível com a conservação *ex situ* no curto prazo. Entretanto, deve-se procurar aumentar o tamanho efetivo dessa população reunindo amostras de outras populações naturais da espécie. Dada à divergência genética entre as regiões de ocorrência de *C. echinata*, a maximização do tamanho efetivo, e conseqüentemente da variabilidade, pode ser conseguida realizando amostragens intensivas em várias populações dentro de regiões.

A coancestria entre as árvores amostradas no arboreto sugere que a população é endogâmica e os indivíduos aparentados no grau de meios-irmãos, enquanto as progênies são formadas por irmãos-completos. Assim, para a coleta de sementes no presente arboreto, com a finalidade de compor lotes comerciais que retenham a variabilidade genética atual, é necessário amostrar sementes em pelo menos 34 árvores matrizes distribuídas aleatoriamente, a fim de se evitar a colheita em indivíduos aparentados.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

João Del Giudice Neto é Mestre em Ciências Florestais e Pesquisador Científico do Instituto de

Botânica de São Paulo - Caixa Postal 4005 - São Paulo, SP 01061-970 - E-mail: jdjudic@ig.com.br

Alexandre Magno Sebbenn é Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas e Pesquisador Científico do Instituto Florestal de São Paulo - Caixa Postal 1322 - São Paulo, SP - 01059-970 - E-mail: alexandresebbenn@yahoo.com.br

Paulo Yoshio Kageyama é Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ / USP - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13400-970 - E-mail: kageyama@esalq.usp.br

Os autores agradecem à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto (Processo nº 2000/06422-4).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, F.F.A. Comportamento ecológico de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-brasil), cultivado em arboreto experimental. **Revista Árvore**, Viçosa, v.16, n.3, p.255-261, 1992.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria n. 06-N de 15 de janeiro de 1992: Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da União**, v.130, n.16, Seção I, 23 jan.1992.

CARDOSO, M.A.; PROVANI, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae - Caesalpinoideae). **Molecular Ecology**, v.7, p.601-608, 1998.

CARDOSO, S.R.S.; PROVANI, J.; LIRA, C.F.; PEREIRA, L.O.R.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A. High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. **Biodiversity and Conservation**, v.14, p.1047-1057, 2005.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1994. 639p.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: SBG/CNPq, 1992. 646p.

GIUDICE NETO, J.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Herança e ligação em locos isoenzimáticos de *Caesalpinia echinata* L. (pau-brasil). **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.16, n.2, p.101-110, 2004.

- GIUDICE NETO, J.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto experimental. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.28, n.2, p.409-418, 2005.
- HARDY, O.J.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.618-620, 2002.
- KAGEYAMA, P.Y. Conservação "in situ" de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, Piracicaba, n.35, p.7-37, 1987.
- KAGEYAMA, P.Y.; CUNHA, G.C.; BARRETO, K.D.; GANDARA, F.B.; CAMARGO, F.R.A.; SEBBENN, A.M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia forestalis**, Piracicaba, v.64, p.108-119, 2003.
- 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.
- LACERDA, C.M.B.; KAGEYAMA, P.Y.; FERRAZ, E.M. Diversidade isoenzimática em *Myracrodruon urundeuva* em duas situações antrópicas no semi-árido. **Scientia forestalis**, Piracicaba, v. 55, p.89-95, 1999.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: versão 1.1 para Windows 95/NT**. 2002. Disponível em: <http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Acesso em: 19/01/2004.
- LINDGREN, D.; GEA, L.; JEFFERSON, P. Loss of genetic diversity by status number. **Silvae Genetica**, v. 45, p. 52-59, 1996.
- LIRA, C.F.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A.; PROVAN, J. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. **Molecular Ecology**, v.12, p.3219-3225, 2003.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Distribución de la variación en espécies de árboles tropicales. **Revista de Biología Tropical**, v.35, Suplemento 1, p.165-175, 1987.
- MELLO FILHO, L.E. A Floresta Atlântica. In: MONTEIRO, S.; KAZ, L. (Coord.) **Floresta Atlântica: textos científicos**. Rio de Janeiro: Edições Albramento, 1991/1992. p.17-21.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v.29, p.1-10, 1975.
- RITLAND, K. Correlated mating in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v.43, p.848-859, 1989.
- RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetic Research**, v.67, p.175-185, 1996.
- SEBBENN, A.M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.14, p.115-132, 2002.
- SEBBENN, A.M. Número de populações para conservação genética *in situ* de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.15, p.45-51, 2003.
- SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOSKY, R. Variabilidade genética, sistema de reprodução e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia forestalis**, Piracicaba, v.53, p.15-30, 1998.
- SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia usando marcadores genéticos. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, p.1-17, 2005.
- SNIEZKO, R.A.; ZOBEL, B.J. Seedling height and diameter variation of various degrees of inbreed and outcross progenies of Loblolly pine. **Silvae Genetica**, v.37, p.50-60, 1988.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. 268p.
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. **BIOSYS-2: a computer program for the analysis of allelic variation in genetics**. Urbana Champaign: University of Illinois, 1997. (users manual).
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations genetics. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420, 1965.