

**EFEITO DO MANEJO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Tabebuia cassinoides* LAM (DC), POR  
MARCADORES ISOENZIMÁTICOS**

**MARIO CAVALLARI NETO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Recursos  
Florestais, com opção em Conservação de  
Ecossistemas Florestais.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Agosto – 2004

**EFEITO DO MANEJO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Tabebuia cassinoides* LAM (DC), POR  
MARCADORES ISOENZIMÁTICOS**

**MARIO CAVALLARI NETO**  
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Recursos  
Florestais, com opção em Conservação de  
Ecossistemas Florestais.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Agosto – 2004

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cavallari Neto, Mario

Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lam (DC), por marcadores isoenzimáticos / Mario Cavallari Neto. - - Piracicaba, 2004.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.  
Bibliografia.

1. Caixeta 2. Diversidade genética 3. Manejo florestal 4. Distribuição espacial I  
I. Título

CDD 634.97354

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

## **Dedico**

**Aos meus pais Gilberto e Dalva, que sempre acreditaram em meu esforço e na forma que encaro a vida, permitindo-me crescer e evoluir com o vigor de minhas crenças e de meus sonhos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao prof. Paulo Yoshio Kageyama, que além de acreditar no fruto deste trabalho, possibilitou-me um amadurecimento científico e pessoal durante esta etapa de minha carreira profissional.

Ao pesquisador Alexandre Magno Sebbenn, pela ajuda imprescindível nas análises estatísticas, pelo companheirismo e por mostrar-me o caminho maravilhoso e investigativo do conhecimento, transmitindo-os sempre de forma entusiasmada, clara e objetiva; e a Rita, pela sua hospitalidade durante os dias de trabalho.

Ao pesquisador Luciano Ribas, pelas fundamentais ajudas em todos as etapas do laboratório, compreendendo desde as corridas até a interpretação das mesmas, além da boa amizade construída.

À equipe técnica do LARGEA, Elza, Andréia e Gelson, pela paciência e pelas importantes ajudas no laboratório.

Ao Dauro e Rui, pela grande ajuda no campo, demonstrando sempre muito entusiasmo no trabalho e grande conhecimento dos caxetais da região de Iguape.

Aos amigos Anderson e Jabá, que trabalharam muito durante as coletas de campo e que em suas companhias o trabalho se tornou mais agilizado e alegre.

Aos amigos pós-graduando do LARGEA, Graciela, Dodô, Thiago, Renato, Edu (Carioca), João (Cobrão), Sybelle, Karina, Nivaldo, Andréia (Pupunha) e Fernando que também contribuíram na execução deste trabalho, sempre demonstrando pertinentes e otimistas visões acadêmicas e profissionais.

À Estação Ecológica da Juréia-Itatins e ao IBAMA, que disponibilizaram toda a estrutura necessária para a execução deste projeto, e aos guarda-parque que

Acompanharam-me e ajudaram-me nos trabalhos de campo.

Aos Srs. Pradel e Luis, moradores da comunidade da “Cachoeira do Guilherme”, pelo abrigo e por mostra-me outras formas de “encarar” e valorizar a natureza, mostrando-me em suas atitudes um sentimento de amor e pertencimento ao meio ambiente.

Aos eternos amigos da República Maracangálha (Beq, Casado, Limão, Biológico, Palmito, Lalas, T-Xeio, Manxa, Gerd, Kuringa e Gabiroba), aos novos (Bolero, Belantonio, Perna de Pau, Da-Lua) e a D. Elza, pela sincera amizade e pelo companheirismo desde o ano de 96, sendo palco de muita alegria e com certeza de muita nostalgia no futuro.

Às minhas irmãs Cláudia e Magda, ao cunhado Di e aos meus maravilhosos sobrinhos Thiago, Amanda e Bruno, por pertencerem à minha família e sempre me acolherem com muita alegria nas poucas visitas que fiz durante a pós-graduação.

À tia Neuza, tio Dirceu, tia Angelina, a Odete e ao Mon Senhor Jorge, pelas constantes ajudas e pela amizade construída durante os anos que passei em Piracicaba.

# SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURA.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A espécie <i>Tabebuia cassinoides</i> Lam DC.....	3
2.2 Eletroforese de isoenzimas.....	3
2.3 Sistema de reprodução.....	5
2.4 Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais.....	7
2.5 Manejo na diversidade genética de espécies arbóreas.....	9
2.6 A dinâmica da Floresta Tropical e o manejo da caxeta.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Caracterização da área de estudo.....	15
3.2 Amostragem.....	17
3.3 Eletroforese de isoenzimas.....	18
3.4 Análise estatística.....	18
3.4.1 Diversidade genética intrapopulacional.....	18
3.4.2 Estrutura genética.....	19
3.4.3 Fluxo gênico.....	20
3.4.4 Autocorrelação espacial.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
4.1 Sistemas isoenzimáticos e herança.....	22
4.2 Frequências alélicas.....	23
4.3 Estrutura genética.....	26
4.4 Fluxo gênico.....	28
4.5 Isolamento por distância.....	29
4.6 Distribuição espacial dos genótipos.....	29
4.7 Diversidade genética.....	39
4.8 Índices de diversidade por classe de diâmetro e intensidade de desbaste.....	42
5 CONCLUSÕES.....	50
ANEXOS.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Mapa esquemático da localização das áreas de estudo.....	16
2 Representação esquemática da interpretação de bandas dos sistemas isoenzimáticos (zimogramas) analisados para <i>Tabebuia cassionoides</i> .....	25
3 Correlograma do índice <i>I</i> de Moran para o método do vizinho mais próximo para sete classes de distância na população (JNA1).....	34
4 Correlograma do índice <i>I</i> de Moran para o método do vizinho mais próximo para dez classes de distância na população (JNA2).....	35
5 Correlograma para o índice <i>I</i> de Moran para o método do vizinho mais próximo para sete classes de distância na população natural da Juréia (JNA3), em <i>T. cassinoides</i> .....	36
6 Correlograma para o índice <i>I</i> de Moran para o método do vizinho mais próximo para sete classes de distância na população natural da Retiro (RMA2), em <i>T. cassinoides</i> .....	37
7 Correlograma para o índice <i>I</i> de Moran para o método do vizinho mais próximo para sete classes de distância na população manejada da Cindomel (CMA), <i>T.cassinoides</i> .....	38
8 Distribuição do número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e da heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_e$ ) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg em 100 amostras aleatórios de populações de tamanho 20, 30, 50, 75 e 100 indivíduos/ha.....	48
9 Distribuição da heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e índice de fixação ( $\hat{f}$ ) em 100 amostras aleatórios de populações de tamanho 20, 30, 50, 75 e 100 indivíduos/ha.....	49



## LISTA DE TABELAS

	Página
1 Quantidade de grupos e indivíduos amostrados nas populações de <i>T. cassinoides</i> .....	17
2 Estimativa das frequências alélicas em populações de <i>T. cassinoides</i> .....	24
3 Estimativa das estatísticas <i>F</i> , usando medidas de Weir & Cockerham (1984) em <i>T. cassinoides</i> .....	26
4 Matrizes de divergência genética e distância geográfica entre pares de populações de <i>T. cassinoides</i> .....	29
5 Estimativa das estatísticas <i>F</i> , usando medidas de Weir & Cockerham (1984), em diversas estruturas amostrais em <i>T. cassinoides</i> .....	32
6 Estimativa de índices de diversidade genética em populações de <i>T. cassinoides</i> .....	40
7 Estimativa de índices de diversidade genética em populações de <i>T. cassinoides</i> (Simulação).....	43
8 Estimativa média de índices de diversidade genética de 100 amostras de populações de <i>T. cassinoides</i> de diferentes tamanhos.....	47

# **EFEITOS DO MANEJO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Tabebuia cassinoides* Lam (DC) POR MARCADORES ISOENZIMÁTICOS**

Autor: MARIO CAVALLARI NETO

Orientador: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

## **RESUMO**

Populações naturais de *Tabebuia cassinoides* Lam (DC) vem sendo intensivamente exploradas a mais de 70 anos, sendo que atualmente restam poucas populações em condições de exploração comercial. Contudo, a pressão para a contínua exploração das populações remanescentes permanece, embora estudos recentes venham indicando que a intensidade de exploração adotada está causando forte perda de diversidade genética. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os impactos do manejo nos níveis de diversidade genética de populações naturais de *T. cassinoides*, usando dados de isoenzimas de amostras de árvores adultas de sete populações, sendo quatro naturais e três manejadas, procedentes do Vale do Ribeira-SP. Foram amostradas aproximadamente 60 árvores por populações, com exceção de uma população, onde foram amostradas 100 árvores e medido o diâmetro a altura do peito (DAP) de cada árvore. Os efeitos do manejo foram avaliados simulando-se diferentes intensidades de desbaste em função de classes de DAP e retenção de diferentes tamanhos populacionais por hectare (20, 30, 50, 75 e 100 genótipos). Os diferentes cenários foram avaliados comparando-se os índices porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}_{95\%}$ ), número médio de

alelos por locos ( $\hat{A}$ ), heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\hat{H}_e$ ) e índice de fixação ( $\hat{f}$ ). A estrutura genética espacial intrapopulacional de cinco das sete populações foi estudada amostrando-se 12 a 20 grupos aleatórios, formados pelas cinco árvores mais próximas. Em cinco populações as coordenadas geográficas das árvores amostradas foram registradas (usando GPS) para o estudo da distribuição espacial dos genótipos. *T. cassinoides* apresenta altos níveis de diversidade genética ( $\hat{A}=3,1$ ;  $\hat{H}_e=0,455$ ;  $\hat{H}_o=0,445$ ) quando comparada a outras espécies arbóreas tropicais. Comparando as médias das populações naturais e manejadas, foram detectados maiores níveis de diversidade genética nas populações naturais ( $\hat{A}=2,64$ ;  $\hat{H}_e=0,491$ ;  $\hat{H}_o=0,504$ ), relativamente as manejadas ( $\hat{A}=2,29$ ;  $\hat{H}_e=0,406$ ;  $\hat{H}_o=0,353$ ). A maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações (mínimo 27,6%). Nas populações naturais, 12,8% da diversidade genética encontra-se entre populações e nas manejadas e 28,4%. Dentro das populações naturais, 12,3% da diversidade genética encontra-se entre grupos e nas manejadas 9,7% encontrava-se entre grupos, sugerindo que a coancestria média dentro das populações aproxima-se da esperada em meios-irmãos (0,125) e, portanto, que existe estrutura genética espacial nas populações de *T. cassinoides*. Igualmente, a análise da distribuição espacial dos genótipos por autocorrelação espacial detectou indícios significativos de estruturação genética espacial até a distância aproximada de 50 m de raio. Na estimativa dos índices de diversidade genética para cinco classes diamétricas não foram detectadas correlações significativas entre as classes diamétricas e os índices  $\hat{A}$  e  $\hat{H}_e$ . Contudo, associações significativas foram detectadas entre as classes diamétricas e os índices  $\hat{H}_o$  ( $\hat{r}=0,813$ ) e  $\hat{f}$  ( $\hat{r}=-0,910$ ), sugerindo que árvores de maiores classes diamétricas apresentam maiores heterozigosidades e existe provável seleção para heterozigotos. Simulando a retenção de diferentes tamanhos amostrais por hectares, observou-se que todos os parâmetros genéticos foram afetados e que é necessário reter aproximadamente

75 árvores por hectare para que os efeitos negativos em relação à população base sejam baixos.

**PALAVRAS-CHAVES:** Diversidade genética; manejo florestal; distribuição genética espacial; parentesco; caxeta (*Tabebuia cassinoides*).

**MANAGEMENT EFFECTS ON CAXETA [*Tabebuia cassinoides* LAM.  
(DC)] NATURAL POPULATIONS GENETIC DIVERSITY BY  
MOLECULAR MARKERS**

Author: MARIO CAVALLARI NETO

Adviser: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

**SUMMARY**

Natural populations of *Tabebuia cassinoides* Lam (DC) have been intensively harvested in the last 70 years. The pressure for continuum exploitation of remaining populations remains, although few populations remain in conditions that allow commercial exploitation and recent studies indicated that intensive harvest causes strong loss of genetic diversity. Thus, the objective of this work was to study the impacts of harvesting on genetic diversity levels of *T. cassinoides* natural populations from Vale do Ribeira-SP, Brazil, using isozymes markers. We collected leaf tissues of adult trees from seven populations, four natural and three harvested. Sixty trees were sampled per population, with the exception of one population, where we sampled 100 trees and also measured their diameter at breast height (DBH). The effects of harvest were evaluated by simulating different logging intensity in this one population, considering several DBH classes and retaining different populational sizes per hectare (20, 30, 50, 75 and 100 remaining trees). The different resulting pictures were evaluated comparing the indexes of the percentage of polymorphic loci ( $\hat{P}_{95\%}$ ), the mean numbers of alleles per locus ( $\hat{A}$ ), observed ( $\hat{H}_o$ ) and expected in Hardy-Weinberg heterozygosity ( $\hat{H}_e$ ) and the

fixation index ( $\hat{f}$ ). The intrapopulation spatial genetic structure was studied in five of the seven populations, sampling 12 to 20 random groups, formed by the five nearest trees. In order to study the spatial genetic structure, we registered, with the use of GPS, the geographic coordinates of the sampled trees in five populations. The results showed that *T. cassinoides* has high levels of genetic diversity ( $\hat{A}=3.1$ ;  $\hat{H}_e=0.455$ ;  $\hat{H}_o=0.445$ ) when compared with other tropical tree species. By comparing the mean values found for the natural and for the harvested populations, we detected higher levels of genetic diversity in natural populations ( $\hat{A}=2.64$ ;  $\hat{H}_e=0.491$ ;  $\hat{H}_o=0.504$ ), relatively to the harvested ones ( $\hat{A}=2.29$ ;  $\hat{H}_e=0.406$ ;  $\hat{H}_o=0.353$ ). The largest part of the genetic diversity was found within population (minimum 27.6%). In natural populations, 12.8% of genetic diversity was found among populations and 28.4% on the harvested ones. Within natural populations, 12.3% of genetic diversity was found among groups and 9.7% in the harvested ones, suggesting that the mean coancestry within population is close to the expected in half-sibs (0.125) and, thus, that there is spatial genetic structure in *T. cassinoides* populations. The analysis of genotypes spatial genetic structure by spatial autocorrelation detected a significant indication for spatial genetic structure at approximately 50 meters distance radius. The genetic diversity index estimation for five diametric classes did not detect significant correlations among diametric classes and  $\hat{A}$  and  $\hat{H}_e$  indexes. However, significant associations were detected among the diametric classes and  $\hat{H}_o$  ( $\hat{r}=0.813$ ) and  $\hat{f}$  ( $\hat{r}=-0.910$ ) indexes, suggesting that trees of the higher diametrical classes have higher heterozygosity and, thus, preferential selection for heterozygous. When simulating the retention of different sample sizes per hectare, we observed that all genetic parameters were affected and that, in order to maintain low negative effects, it is necessary to retain approximately 75 trees per hectare.

**KEY WORDS:** genetic diversity; forest management; spatial genetic structure; relatedness; caxeta (*Tabebuia cassinoides*).

## 1 INTRODUÇÃO

Os caxetais são considerados como comunidades de planícies aluviais que refletem os efeitos das cheias dos rios nas épocas chuvosas ou das depressões permanentemente alagáveis, onde esse ecossistema é denominado de formação pioneira com influência fluvial (IBGE, 1992). Apresentam nesses ambientes uma baixa diversidade de espécies vegetais, além de possuir uma freqüência irregular e descontínua, uma vez que sua ocorrência é afetada devido às condições hídricas de saturação do solo.

Ocorriam naturalmente em boa parte do litoral brasileiro, compreendendo os Estados de Pernambuco à Santa Catarina, sendo a *Tabebuia cassinoides* Lam DC considerada como uma espécie exclusiva destes caxetais, ocorrendo na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) e nas formações Terras Baixas e Baixo-Montana (Lorenzi, 1998). Ocorre, também, na restinga, onde ocupa o extrato superior e intermediário. Essa espécie vem sendo intensamente explorada desde o começo do século passado e inúmeros fatores têm colaborado para sua degradação, compreendendo o sistema tradicional de exploração, a construção de estradas que modificam o regime hídrico do caxetal, a pressão imobiliária, além da eliminação das florestas para a implantação de cultivos agrícolas e da pecuária. Verifica-se atualmente que muitas de suas populações já desapareceram, ou apresentam-se abandonadas devido à baixa produtividade (Sebbenn et al., 2001).

Seu histórico de exploração começa na década de 30 Diegues & Viana (2000), quando era destinada à produção de tamancos, instrumentos musicais e brinquedos, devido à leveza e maleabilidade da madeira, sendo que na década de 50 a caixeta passou a ser destinada à produção de lápis. A exploração proporciona alterações nos tamanhos populacionais e nos padrões espaciais dos indivíduos dentro das populações (Bawa &

Krugman, 1990; Murawski, 1995). A redução drástica no tamanho das populações, através do corte seletivo, pode levar à deriva genética, caracterizada pela perda e fixação aleatória de alelos e ao aumento do parentesco e da endogamia dentro das populações (Crow & Kimura, 1970; Ellstrand & Elam, 1993; Falconer & Mackay, 1997). A deriva genética pode inviabilizar os programas de manejo, pela redução da capacidade adaptativa, reprodutiva e produtiva das espécies. As alterações na distribuição espacial dos indivíduos dentro das populações também podem levar às mudanças na densidade e no comportamento dos polinizadores, gerando alterações nos níveis de cruzamento, como o aumento da autofecundação e conseqüentemente da endogamia (Bawa & Krugman, 1990; Murawski, 1995). Em plantas alógamas, a endogamia origina a depressão por endogamia, que é a expressão dos genes letais e deletérios em homozigose, caracterizada pela redução na produtividade, fertilidade, viabilidade das sementes, vigor e adaptação (Crow & Kimura, 1970; Geburek, 1986; Falconer & Mackay, 1997).

Este trabalho investiga os efeitos do manejo na diversidade e a estrutura genética de *T. cassinoides*, comparando níveis observados em populações naturais e manejadas. Assim, os objetivos deste estudo foram:

1. estudar a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações naturais e manejadas de *T. cassinoides*;
2. comparar os níveis de diversidade genética em populações naturais e manejadas;
3. estudar a estrutura genética espacial de *T. cassinoides*;
4. avaliar os efeitos de diferentes intensidades de exploração na diversidade genética das populações;
5. definir diretrizes para o manejo e para a conservação genética da espécie.



## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Espécie *Tabebuia cassinoides* Lam DC.**

A *Tabebuia cassinoides* (Lam) DC, ou caxeta é uma espécie arbórea tropical endêmica brasileira pertencente à Família Bignoniaceae (Lorenzi, 1998). A espécie possui hábito pioneiro; apresenta altura variando de 3 a 13 m e DAP de 10 a 30 cm, raramente atingindo mais de 20 m de altura ou mais de 100 cm de DAP. A copa é pequena, o tronco irregular, geralmente tortuoso, ramificação simpodial, com dominância apical, apresentando um fuste pequeno variando de 5-7 m de comprimento. As folhas são simples, opostas, lanceoladas, coriáceas, glabras, com 10-20 cm de comprimento e 4-8cm de largura. As flores são hermafroditas, de coloração variando de branca a amarelada, com estrias roxas, perfumadas, sendo polinizadas principalmente por abelhas. Os frutos são do tipo siliqua estriada de 13-20 cm de comprimento, com numerosas sementes e sua dispersão ocorre por anemocoria e hidrocoria (Carvalho, 1994).

Os produtos advindos da espécie são lápis, tamancos, pranchetas, palitos de fósforo, instrumentos musicais (viola, violão), brinquedos, saltos de sapatos, caixotaria, moldura para quadros, bóias de salva-vidas, artesanatos (entalhada e esculpida), restauração ambiental de áreas sobre influência pluvial (Carvalho, 1994).

### **2.2 Eletroforese de Isoenzimas**

Uma ferramenta que tem sido usada com grande eficiência para a análise do sistema de reprodução e da estrutura genética de populações de espécies de plantas é a técnica de eletroforese de isoenzimas, tendo sido empregada na grande maioria dos estudos populacionais com plantas. A eletroforese de isoenzimas consiste na migração de enzimas em um gel submetido à influência de um campo elétrico, na qual o produto

enzimático resultante da ação de diferentes alelos é denominado de isoenzima (Gandara, 1996). Para tal, emprega-se extratos protéicos obtidos por maceração do tecido vegetal em soluções extratoras apropriadas. Em seguida, os géis são fatiados e revelados, visando a presença de proteínas totais ou enzimas específicas. Para isto, os géis são incubados em soluções específicas, contendo os componentes (substrato, coenzimas, solução-tampão e sais) necessários para a revelação das bandas de atividade enzimática visualizadas no gel, denominadas isoenzimas, sendo o conjunto de bandas reveladas nos géis denominadas de zimograma. A variação na intensidade de bandas é função da atividade enzimática, da estrutura quaternária da enzima, do número de locos e número de alelos no loco que contribuem para a síntese da enzima (Alfenas et al., 1991). A taxa de migração é determinada pelo tamanho, forma e carga da proteína. As isoenzimas são controladas geneticamente por um ou vários genes, situados num mesmo loco ou em diferentes locos (Alfenas, 1998).

A diversidade genética e a estrutura genética de populações podem ser caracterizadas usando caracteres quantitativos, avaliados em testes de procedências e progênes e, com base em dados de marcadores genéticos. Contudo, a técnica de eletroforese de isoenzimas apresenta algumas vantagens sobre os métodos clássicos de genética quantitativos nessas análises, como: a herança genética das características detectadas poder ser facilmente demonstrada; a maioria dos locos são codominantes e as frequências gênicas podem ser calculadas, diretamente sem a necessidade de cruzamentos genéticos; as estimativas da variabilidade genética podem ser comparadas diretamente entre populações ou espécies e; um conjunto de locos podem ser acessados utilizando-se de pequena quantidade de material vegetal (Hamrick et al., 1979; Hamrick, 1989).

Os marcadores genéticos apresentam diversas aplicações na conservação genética dos recursos florestais, por meio da mensuração da diversidade genética, estimativas das taxas de fluxo gênico ou migração, caracterização do sistema de reprodução, análise de paternidade, avaliação da eficiência do pomar de sementes, estudos filogenéticos e taxonômicos, podendo ser mensuradas diferenças genéticas em populações naturais e manejadas (Glaubitz & Moran, 2000). Outras vantagens da

eletroforese de isoenzimas seriam: permitir a caracterização da estrutura genética das populações em curto espaço de tempo, não exigir área experimental, limite no número de populações a serem estudadas e os custos equivalerem aos métodos clássicos de experimentação de campo, além das enzimas serem consideradas como uma expressão direta dos genes, o que aumenta a precisão das estimativas dos parâmetros genéticos (Stebbins, 1989).

### **2.3 Sistema de reprodução**

O sistema de reprodução de uma população determina como as informações genéticas são transferidas entre gerações, podendo influenciar fortemente o potencial de recombinação da população (Allard, 1971) e, portanto, determinar em parte a estrutura genética espacial e temporal da espécie (Ritland & Jain, 1981; Brown, 1989; Murawski et al., 1994). Como atividades de conservação e uso das espécies dependem do conhecimento da estrutura genética das populações é importante conhecer detalhadamente o sistema de reprodução.

O sistema de reprodução pode ser eficientemente estudado com base em dados de marcadores genéticos, devido à herança mendeliana simples dessas marcas. É conhecido que as espécies florestais apresentam uma ampla variedade de sistema de reprodução, incluindo cruzamentos, autofecundação, apomixia e combinações destas. Estudos de Bawa (1974, 1985) e Ashton (1976) mostraram a predominância de fecundação cruzada nas espécies florestais tropicais e fortes pressões seletivas para a manutenção da diversidade genética das espécies. Os resultados de Bawa mostraram as estratégias adotadas pelas espécies florestais para evitar a autofecundação e forçar o cruzamento, como auto-incompatibilidade, forçando a recombinação e, permitindo desse modo, a manutenção de alta variabilidade genética nas populações.

Como em populações de espécies alógamas todas as plantas apresentam locos em heterozigose, muito da carga genética presente é mascarada por estes locos, sendo que a autofecundação gera endogamia e, quase sem exceção, resulta em deterioração geral do vigor, bem como o aparecimento de outros efeitos adversos (Allard, 1971).

Possivelmente, é por esta razão que a auto-incompatibilidade e outros mecanismos de exocruzamento evoluíram em numerosas espécies de plantas (Futuyma, 1992).

O sistema de reprodução das espécies florestais pode ser caracterizado pelo modelo misto de reprodução (Ritland & Jain, 1981) e cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989). O modelo de reprodução mista divide o processo de reprodução em dois componentes: cruzamentos aleatórios e autofecundação (Brown & Allard, 1970; Clegg, 1980; Ritland & Jain, 1981; Schoen & Clegg, 1984). Este modelo é o mais difundido para a avaliação do sistema de reprodução em plantas a partir de dados de marcadores genéticos (Clegg, 1980).

O modelo de cruzamento misto de Ritland & Jain (1981) admite que as populações se reproduzem por autofecundação a uma taxa  $s$  e por cruzamentos aleatórios a uma taxa  $t$  (Ritland & Jain, 1981; Hamrick, 1989; Ritland, 1990). As pressuposições básicas para a sua aplicação são: (a) que os genótipos foram gerados por cruzamentos aleatórios ou autofecundação; (b) que as frequências alélicas do pólen são homogêneas para todos os cruzamentos com os genótipos maternos; (c) que a taxa de cruzamento é independente do genótipo materno; e (d) que não existe seleção atuando nos marcadores entre o período de cruzamento e a avaliação genética das progênes (Ritland & Jain, 1981; Ritland, 1990).

A reprodução predominantemente por cruzamentos favorece a alta heterozigosidade dentro das populações, reduzidos os níveis de divergência genética entre as populações, devido ao intenso fluxo de pólen entre as populações e grandes tamanhos efetivos ( $N_e$ ) e de vizinhança ( $N_b$ ) com reduzida subdivisão dentro de populações. O sistema misto de reprodução prediz variabilidade genética intermediária entre espécies de autofecundação e de reprodução aleatória, potencial para a diferenciação entre populações, dependendo do nível de autofecundação, podendo variar no tempo e potencial para a subdivisão dentro de populações, dependendo do balanço entre autofecundação e cruzamentos (Loveless & Hamrick, 1984).

## 2.4 Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais

Segundo Hamrick (1983) e Loveless & Hamrick (1987), o estudo da diversidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis de variação genética mantida dentro das populações, bem como a forma em que a variação genética é dividida entre e dentro das populações. A diversidade genética intrapopulacional pode ser caracterizada pelos índices: porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}$ ), número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ), heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\hat{H}_e$ ), heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e índice de fixação ( $\hat{f}$ ) (Berg & Hamrick, 1997). Hamrick & Godt (1990) reportam heterozigosidade média esperada de 0,123 para espécies com dispersão por anemocoria e de 0,124 para espécies polinizadas por animais. Loveless & Hamrick (1984) comentam que as espécies tipicamente alógamas apresentam alta variação genética dentro e pequena entre populações, sendo que a divergência entre é tanto menor quanto maior for o fluxo gênico.

Verifica-se que, em populações de baixa densidade, a ocorrência de fenômenos genéticos como a deriva genética, que provoca perda da variação genética rapidamente em pequenas populações e a endogamia (autofecundações e cruzamento entre indivíduos aparentados), ocasionam a perda da heterozigosidade. Portanto, para a efetiva conservação genética ou exploração de uma espécie, deve-se conhecer a forma em que a variação genética ocorre entre e dentro das populações, bem com o entendimento dessa variação no tempo e no espaço. Estudos da estrutura intrapopulacional de espécies arbóreas têm demonstrado que a distribuição de alelos e genótipos não é aleatória dentro das populações (Coles & Fowler, 1976; Loveless & Hamrick, 1984; Chung & Epperson, 2000). Tal estrutura pode ser determinada pela dispersão de pólen e sementes, habitat de distribuição e seleção microambiental (Hamrick, 1983). A relação temporal e espacial entre indivíduos próximos aumenta a probabilidade de intercruzamento e se os mecanismos de dispersão de pólen e sementes forem restritos a uma pequena vizinhança, aumentam as chances destes indivíduos serem aparentados (Coles & Fowler, 1976). O cruzamento entre parentes gera endogamia, apesar de ser uma forma menos drástica do que a autofecundação efetiva, porém é a única forma de ocorrência de endogamia em

espécies que apresentam sexos separados (Allard, 1971). Muito da endogamia observada dentro de populações naturais de espécies florestais é determinado pela distância e taxa com que os genes migram dentro e entre populações (Coles & Fowler, 1976). A outra parte é determinada por seu sistema de reprodução, mais especificamente, pela taxa de autofecundação. Se o movimento de genes é extenso, resultando em fluxo gênico a longa distância são esperadas baixa endogamia dentro das populações e baixa divergência genética entre populações. Se, contudo, o fluxo de genes efetivo é limitado e a troca gênica entre árvores vizinhas é comum, pode ocorrer uma alta proporção de endogamia dentro das populações e alta divergência entre as populações (Coles & Fowler, 1976). Entretanto, caso o movimento de genes via pólen seja longo e via sementes seja restrito, é esperada baixa endogamia dentro das populações, moderados níveis de divergência genética entre as populações, mas alto parentesco dentro das populações (população estruturada em famílias).

Após um evento natural ou de um manejo da floresta, poderá ocorrer um efeito denominado de estrutura de famílias, ou seja, está associado à forma em que os genes estão distribuídos no espaço, formando sub-populações ou demes homogêneas, através das maiores chances de ocorrer cruzamentos entre aparentados, levando à fixação de alelos raros, deriva genética e a indução de endogamia, promovendo um aumento da divergência genética entre populações (Young et al., 1996). A diferenciação entre as populações é aumentada pela seleção e deriva genética, sendo que espécies com elevado movimento de pólen e sementes, em geral, possuem menor diferenciação do que espécies com fluxo gênico restrito (Hamrick, 1989). Kageyama & Lepsch-Cunha (2001) discutem que o fluxo gênico via pólen e sementes está associados à estrutura genética das populações de espécies arbóreas tropicais, onde a distância do vôo dos polinizadores e dispersores pode predizer a variação genética dessas espécies.

Espécies arbóreas florestais, geralmente possuem um grau relativamente alto de variações genéticas, comparadas com outras plantas e espécies animais (Mitton, 1983; Ledig, 1986). Este grau alto de variação ao nível molecular de variantes de isoenzimas frequentemente é assumido como uma reflexão de recentes eventos históricos e o sistema de cruzamento, do que o resultado de adaptações ambientais que coletivamente

definem a estrutura genética de uma população (Ledig, 1986). Hamrick (1983) discute que o padrão genético da floresta tropical, onde processos como a dispersão de pólen e sementes, estágios sucessionais e o sistema reprodutivo devem ser analisados, o que influencia a distribuição espacial da variabilidade genética entre e dentro das populações das árvores em uma floresta contínua, ressaltando que plantas em estágios iniciais de sucessão possuem maior distância genética entre populações e com fluxo gênico mais restrito ou contrário das espécies de final de sucessão. Moraes (1993) encontrou esse padrão para a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), sendo considerada rara e apresenta pequena variabilidade genética entre suas populações.

## **2.5 Manejo na diversidade genética de espécies arbóreas.**

Humanos têm convertido florestas para usos na agricultura e urbanização, explorando espécies, fragmentando as terras selvagens, mudando a estrutura demográfica das florestas, alterando o habitat, degradando o ambiente e poluindo a atmosférica e o solo, introduzindo pestes exóticas e competidores, e favorecendo espécies domesticadas. Nenhuma dessas atividades é nova, com exceção da poluição atmosférica, elas datam da pré-história. Todas têm impactado a diversidade genética (exemplo, diversidade de espécies e diversidade genética dentro de espécies) pelas suas influências sobre os processos evolutivos de extinção, seleção, deriva, fluxo gênico e mutação, algumas vezes aumentando a diversidade como em alguns casos de domesticação, mas outras vezes reduzindo a diversidade genética. Mesmo na ausência de mudanças na diversidade genética, o sistema de reprodução tem sido alterado, mudando a estrutura genética das populações (Ledig, 1992).

A diversidade genética promove a matéria prima para adaptação, evolução e sobrevivência das espécies e indivíduos, especialmente sobre mudanças ambientais e condições de doenças. A variabilidade genética é também a base para o melhoramento genético. Como as espécies arbóreas são normalmente as espécies chaves dos ecossistemas florestais, devido a sua vida longa, sua diversidade genética tem um significado especial. Redução na diversidade genética pode predispor as espécies a doenças, reduzir a produtividade e limitar o melhoramento genético. Assim, a

diversidade genética pode ser vista como fundamental para a sustentabilidade e estabilidade do ecossistema (Rajora & Pluhar, 2003).

O manejo florestal sustentado e a exploração ordenada das florestas naturais e plantadas visam à produção contínua de madeira, resina, gomas, etc. Para atingir este objetivo os programas de manejo devem ser delineados com base em medidas de incremento médio anual (IMA), incremento corrente anual (ICA), obtidos em inventários contínuos em amostras dos diversos tipos de sítios (solo) em que o plano de manejo é desenvolvido. Contudo, o manejo de populações naturais também deve considerar a constituição genotípica dos indivíduos das espécies alvo da exploração, a qual é a responsável por parte das diferenças de produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos de uma espécie. No entanto, apesar da grande importância destes fatores genéticos para a exploração florestal sustentada de uma espécie, tal componente tem sido subjugado nos planos de manejo em florestas tropicais naturais, sendo que não existem programas de manejo florestal que considerem o componente genético como um dos fatores primordiais para a real efetivação da sustentabilidade (Sebbenn et al., 2000).

O manejo de espécies arbóreas tropicais para a produção sustentada depende do entendimento dos efeitos das práticas de exploração sobre a reprodução contínua das árvores e a manutenção da diversidade genética. O manejo seletivo envolve a extração de uma proporção de árvores de tamanho reprodutivo (Murawski, 1994). Essa prática necessariamente reduz a densidade populacional local de florescimento que, em outros termos, pode reduzir a densidade de polinizadores (Murawski, 1995). Murawski et al. (1994) estudando os efeitos do manejo sobre o sistema de reprodução de uma espécie arbórea tropical de dossel endêmica da Sri Lanka, compararam uma população manejada com uma não manejada e detectaram maior taxa de autofecundação na população manejada (0,290) em comparação a não manejada (0,130). Sebbenn et al. (2001) comparando o sistema de reprodução de uma população manejada e uma não manejada (natural) de *T. cassinoides* detectou maior taxa de autofecundação (0,217) na população manejada relativamente a natural (0,105). Efeitos ainda mais drásticos foram detectados por Obayashi et al. (2002), comparando o sistema de reprodução de uma população natural e uma manejada de *Shorea curtisi*; onde a taxa de autofecundação foi de 0,478



na população manejada e de 0,037 na população não manejada. A causa das maiores taxas de autofecundações em populações manejadas pode estar associada ao fato de que o manejo reduz a densidade de árvores reprodutivamente maduras em áreas manejadas, podendo afetar o comportamento dos polinizadores, de tal forma que seu movimento tende a ocorrer predominantemente dentro da copa das árvores. Outro aspecto importante foi detectado por Sebbenn *et al.* (2001) que observou que a correlação de paternidade ( $r_p$ ) ou a proporção de progênies de cruzamentos que são irmãos-completos era de 54,7% na população não manejada e de 29,5% na manejada, indicando que a parte da reprodução que ocorreu por cruzamento na população manejada foi mais aleatória comparativamente a população não manejada. Isto pode ter sua causa atribuída ao mesmo fator que favoreceu a maior taxa de autofecundação, ou seja, a redução na densidade populacional poderia ter favorecido a visita de vários polinizadores as copas das árvores devido à escassez de flores. Outro aspecto ainda observado por Sebbenn *et al.* (2001) foi que a taxa de cruzamentos endogâmico foi menor na população manejada (0,092) em relação à não manejada (0,175). Os autores atribuíram isto ao fato de que o manejo elimina parte da população, de forma que se esta apresentar estrutura genética espacial, muito do parentesco intrapopulacional será removido, reduzindo a probabilidade de ocorrerem cruzamentos entre indivíduos parentes e gerar endogamia biparental. Por outro lado, os resultados de Murawski *et al.* (1994) não suportaram esta hipótese, observando maiores taxas de cruzamentos entre indivíduos parentes, em uma população manejada (0,062) em comparação a uma natural (0,017) de *S. curtisi*, atribuindo o fato à possibilidade de que em populações manejadas indivíduos próximos possam ser menos parentes entre si do que populações não manejadas.

## **2.6 A dinâmica da Floresta Tropical e o manejo da caxeta**

O Decreto nº 750, de 10 de fevereiro de 1993, que dispõe sobre o corte, a exploração e a supressão de vegetação primária ou nos estágios avançado e médio de regeneração da Mata Atlântica, visando permitir a execução de projetos de manejo sustentável de espécie da Floresta Atlântica, fundamentados em estudos prévios técnico-científicos de estoques e de garantia da capacidade de manutenção da espécie alvo.

Para entender o comportamento da comunidade florestal, verifica-se a necessidade de eleger espécies modelos, que representem um determinado grupo ecológico, contendo padrões de fluxo de pólen e sementes, de distribuição espacial, de estágio sucessional, além das respostas demográficas intrínsecas a cada grupo quando sujeitas as perturbações antrópicas (Kageyama, 2001).

Na elaboração de conceitos a respeito da inclusão das espécies vegetais em grupos sucessionais, nota-se a importância dos pesquisadores Budowski (1965), Denslow (1980) e Martinez-Ramos (1985), sabendo-se que na Floresta Tropical ocorre à sucessão secundária e a sucessão antrópica, ou seja, quando parte da floresta for destruída de forma natural ou antrópica, torna-se de extrema importância o conhecimento das características intrínsecas de cada grupo ecológico, como taxas de crescimento, tolerância ao sombreamento, dispersão e tamanho das sementes, dormência das sementes, tempo de vida, idade da primeira reprodução, dependência de polinizadores específicos, IVI (Índice de Valor de Importância) e tempo de vida (Ferretti et.al 1995). As Florestas Tropicais possuem alta diversidade de espécies arbóreas e está relacionada com a grande quantidade de espécies raras, ou seja, as espécies que ocorrem em baixa densidade demográfica (Lepsch-Cunha, 1996).

As espécies raras são predominantes na Floresta Tropical e evoluíram para serem raras, pois seu fluxo gênico (pólen/sementes) é compatível com sua raridade, sendo de clareiras pequenas, respeitam a teoria de Janzen, possuem plântulas temporárias, são espécies secundárias na sucessão, possuem distribuição normal para o gráfico de diâmetros e apresentam dificuldades de amostragem, sendo apontadas como referência para o monitoramento das reservas genéticas (Kageyama & Gandara, 1994).

Com o tempo, mudanças na variação genética ao nível de espécies serão determinadas pelos efeitos do isolamento do fragmento na presença e comportamento de polinizadores e frugívoros, pelas taxas resultantes de migração de pólen e sementes contra extinção e recolonização e pelas perturbações antrópicas. Para Cooper (1926) e Watt (1947), os distúrbios florestais são reconhecidos ao longo do tempo como importantes fatores que afetam a estrutura e a dinâmica da comunidade florestal, passando recentemente a ser considerado um fenômeno natural e antrópico e que ocorre

em diferentes escalas temporais e espaciais. Análises dos distúrbios em cada nível hierárquico e suas interações são vitais para a compreensão da importância do distúrbio como um fenômeno natural.

A escala temporal e espacial de um evento (regime de distúrbio) pode determinar se este é um distúrbio e até que nível hierárquico ele afeta, na qual é afetado pela mudança na estrutura mínima causada por um fator externo para um determinado nível de interesse, ocorrendo a destruição física da entidade (Rykiel, 1985). Cada foco de estudo requer um modelo hierárquico diferente, sendo que há apenas um modelo de estrutura mínima apropriado para cada foco de estudo, sendo considerado como um degrau inicial para maiores generalizações e previsões mais refinadas sobre o estudo dos distúrbios (Pickett, 1989). É essencial para ter uma medida quantitativa desta hierarquia ao avaliar a diversidade genética, estando frequentemente baseado na caracterização da quantidade e da distribuição da diversidade genética nessa hierarquia, ou seja, a estrutura genética da população torna-se a informação parte mais fundamental para espécies que requerem manejo genético (Brown, 1978).

Para tal, verifica-se que a caixeta (*Tabebuia cassinoides*) possibilita um plano de manejo que hoje é aprovado pelo IBAMA e pelo DEPRN, através da Resolução SMA-92, permitindo seu manejo através de rendimento auto-sustentado. Sebbenn et al., (2000) relatam a importância da diversidade genética nos ecossistemas tropicais, sabendo-se que os planos de manejo vigentes nas florestas tropicais não incluem a questão da diversidade genética das espécies como aspectos fundamentais e que esses parâmetros são responsáveis pelas diferenças em produtividade, adaptação e reprodução da população. Portanto, parâmetros genéticos e ecológicos são importantes para o manejo sustentável das florestas tropicais, onde a possibilidade de retomada de crescimento (regeneração, recrutamento) de uma população deverá ser conhecida, a fim de proporcionar novos ciclos de exploração, na busca de manter a integridade das populações, verificando-se que algumas espécies apresentam características em comum, e que questões referentes à raridade, dimensão da árvore e o material que será explorado, deverão ser conhecidas para que o manejo dos recursos da floresta seja sustentável, além da necessidade de abranger critérios econômicos e sociais (Kageyama, 2000).

Reis et al. (1992), ressaltaram que as espécies comuns, como o açaí (*Euterpe oleraceae*) e o palmito (*Euterpe edulis*), têm sido apontadas como espécies ideais para o manejo racional. (Kageyama 2001) criou cinco grupos modelos, sendo que a espécie *Tabebuia cassinoides* se enquadra num desses modelos, como especialista de habitat, com populações abundantes e agregadas sobre sítios edáficos restritivos (solos encharcados), denominadas como uma espécie clímax edáfica. As espécies arbóreas clímax edáficas que estão sob regime de exploração sob rendimento auto-sustentável, como é o caso da *Tabebuia cassinoides*, possuem poucas espécies em sua comunidade, porém com uma densidade elevada de indivíduos por área. Portanto, o conhecimento da influência antrópica em sua estrutura ecológica e genética deve ser considerado como prioritário, por ser uma espécie importante pela possibilidade de realização de um modelo de manejo racional para sua exploração e conservação *in situ*. A *Tabebuia cassinoides* apresenta elevado índice de variabilidade genética decorrente de características ecológicas inerentes à espécie, sendo considerada como comum, com elevada densidade populacional e mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes entre e dentro das populações, além da possibilidade de regeneração por rebrotos e raízes geminíferas. Segundo Sebbenn et al.(2000), esse fato possibilita a construção de novas combinações genotípicas e por extensão garantir sua adaptação e evolução. Através da Resolução SMA-92 (Anexo A), vimos que torna-se necessário a manutenção de pelos menos 20 árvores porta sementes por ha, além da manutenção de todos os indivíduos que possuem DAP < 15 cm.

Portanto, a biodiversidade da Floresta Tropical se torna muito importante, quando se busca compreendê-la através do conhecimento das interações biológicas, caracterizando a reprodução, a sucessão ecológica e a estrutura das populações (ecologia e genética), além de fornecer parâmetros confiáveis na busca da conservação, do manejo e da restauração das espécies.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Caracterização da área de estudo**

Para este estudo foram amostradas populações naturais de *T. cassinoides* na Estação Ecológica da Juréia-Itatins e nas propriedades particulares da Fazenda Cindomel e da Fazenda Retiro (Figura 1). A escolha destas áreas buscou detectar o possível efeito do manejo na diversidade genética das populações naturais de *T. cassinoides*, sendo que estas propriedades particulares (Cindomel e Retiro) executaram o plano de manejo aprovados pelo IBAMA e pelo DEPRN, seguindo a Resolução SMA-11, de 13/04/92 (Anexo 1). Por outro lado as populações localizadas na Juréia são consideradas como populações mais conservadas geneticamente e portanto, utilizadas como referências para implicações deste modelo de manejo vigente.

A Estação Ecológica da Juréia-Itatins foi criada por meio dos Decretos de 20 de Janeiro de 1986 pela Lei 4.417, de 29 de Abril de 1987, com uma área de aproximadamente 79.270 ha, compreendendo a faixa litorânea do Estado de São Paulo, entre os municípios de Iguape e Peruíbe (Mantovani, 1993).

A fazenda Cindomel situa-se na latitude 24°23' S e longitude 47°33'W e localiza-se a aproximadamente 20 km do município de Iguape. O clima, segundo Köppen é do tipo Cfa, definido como tropical úmido, sua pluviosidade anual média é superior a 2.010 mm e a temperatura média anual é superior à 20°C, caracterizando um regime hidrológico tropical (IAC, 1990). Possui uma área total de 2.720 ha e atualmente apresenta um caxetal de 40 ha. O caxetal dessa população foi escolhido por ter apresentado um plano de manejo no ano de 1999, e por possuir um histórico de perturbação, sendo que parte da floresta havia sido explorada no ano de 1985.

A fazenda Retiro está compreendida entre a latitude 24° 34'S e longitude 47° 33'W e localiza-se a aproximadamente 20 km do município de Iguape-SP, às margens

da Rodovia SP 222. O clima da região é segundo Köppen é do tipo Cfa, definido como tropical úmido (IAC, 1990). Possui uma área total de 180 ha, onde a área de caxetal ocupa 15 ha. Informações sobre a primeira intervenção de extração de caules de caxeta datam de 1969 sendo que a segunda intervenção ocorre após o ano de 1994.



Figura 1 - Localização das áreas de estudos, municípios de Iguape e Peruíbe. Adaptado de (Borges, 1997)

### 3.2 Amostragem

Foram amostradas sete populações, sendo quatro populações naturais (JNA1, JNA2, JNA3 e JNA4) aparentemente não manejadas e três populações manejadas (CMA, RMA1 e RMA2) Tabela 1. As populações naturais encontravam-se localizadas no Parque Estadual da Juréia-Itatins e as manejadas estavam situadas na Fazenda Cindomel e Retiro. Para avaliar a possível existência de estruturação ou grupos de famílias dentro das populações, os indivíduos adultos da *T. cassinoides* foram amostrados em forma de pequenos grupos aleatórios, constituídos pelas cinco árvores mais próximas entre si, em três populações naturais (JNA1, JNA2, JNA3) e em duas manejadas (CMA, RMA2). Os grupos foram formados a partir de um caminhamento aleatório na população e quando uma árvore era amostrada, as quatro árvores mais próximas também o eram. De cada árvore eram retirados tecidos foliares e anotada sua localização geográfica, usando o GPS. Como em quase todas as populações foram amostradas 60 árvores, foram criados 12 grupos aleatórios dentro de cada população. Com o intuito de estudar os efeitos de diferentes intensidades de exploração, em uma população natural foram amostradas 100 árvores o que resultou na formação de 20 grupos. De cada árvore mediu-se o CAP (circunferência à altura do peito - 1,3 m), usando uma fita métrica. Além destas cinco populações amostradas em forma de grupos, também foram incluídas amostras de duas outras populações, uma natural (JNA4) e uma manejada (RMA1), já descritas em Sebbenn et al. (2001).

Tabela 1. Quantidade de grupos e indivíduos amostrados nas populações de *T. cassinoides*

	NATURAIS				MANEJADAS		
Populações	JNA1	JNA2	JNA3	JNA4	CMA	RMA1	RMA2
Grupos	12	20	12	X	12	X	12
Indivíduos	60	99	60	57	59	59	52

### 3.3 Eletroforese de isoenzimas

As “corridas” eletroforéticas foram realizadas no LARGEA (Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas). A eletroforese de isoenzimas foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel a 13% de amido de milho e amido de batata, na proporção 2:1. Foi elaborado um protocolo, com tecidos de indivíduos adultos, na qual foram testados diferentes sistemas enzimáticos e diferentes sistemas de tampão, freqüentemente utilizados, e citado por Alfenas (1998). Os sistemas tampão gel/eletrodo e sistemas enzimáticos foram avaliados de acordo com a qualidade dos padrões de bandas obtidos nas amostras, nas diferentes condições da corrida. As bandas foram avaliadas quanto à atividade enzimática e quanto à resolução das mesmas, sendo selecionados os que apresentaram melhor atividade enzimática em relação ao padrão de resolução.

No presente estudo, os sistemas passíveis de interpretação foram: o MDH (Malato Desidrogenase- E.C. 1.1.1.37), PGI (Fosfogluose Isomerase- E.C. 5.3.1.9), PGM (Fosfoglucomutase- E.C. 2.7.5.1), LAP (Leucina Aminopeptidase- E.C. 3.4.11.1), IDH (Isocitrato Desidrogenase- E.C.1.1.1.42), SKDH (Xiquimato Desidrogenase- E.C. 1.1.1.25),  $\beta$ -EST ( $\beta$ -Esterase-EC 3.1.1.1) e 6-PGDH (6-Fosfogluconato Desidrogenase- E.C. 1.1.1.44).

### 3.4 Análise Estatística

#### 3.4.1 Diversidade genética intrapopulacional

A diversidade genética dentro das populações foi caracterizada pela heterozigosidade observada ( $H_e$ ), heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), número médio de alelos por loco ( $A$ ), porcentagem de locos polimórficos ( $P$ ) e índices de fixação de Wright ( $F$ ), estimativas estas obtidas a partir do programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989). Também foram estimados os tamanhos efetivos populacionais ( $N_e$ ). As freqüências alélicas foram estimadas por:  $p_{ij} = n_{ij} / n_{.j}$ , em que  $p_{ij}$  = freqüência do alelo  $i$  na população  $j$ ;  $n_{ij}$  = número de



ocorrência do alelo  $i$  na população  $j$ ;  $n_j$  = número total de alelos amostrados na população  $j$ . O índice  $\bar{H}_o$  para cada loco foi obtido por  $\bar{H}_o = 1 - \sum P_{ii}$ , em que:  $P_{ii}$  = frequência do homozigoto  $ii$  e,  $\bar{H}_e$  por  $\bar{H}_e = 1 - \sum p_{ij}^2$ , em que:  $p_{ij}$  = frequência alélica estimada do  $i$ -ésimo alelo no  $j$ -ésimo loco. O valor do índice  $\bar{P}$  foi calculado pela média aritmética do número total de locos polimórficos, dividido pelo número total de locos avaliados, sendo que um loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassar 95%. O valor do índice  $\bar{A}$  foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. O índice  $\bar{f}$  foi estimado para cada loco pelas expressões (Weir, 1996):

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

### 3.4.2 Estrutura Genética

A estrutura genética das populações ou a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações foi caracterizada pela análise da variância de frequências alélicas, usando modelos aleatórios hierárquicos construídos com base nas derivações de Weir (1996). Dois modelos foram utilizados. O primeiro modelo para a análise da variância incluirá os efeitos hierárquicos de genes dentro de indivíduos e indivíduos dentro de populações:

$$Y_{ikl} = m + p_i + b_{k(i)} + g_{l(ik)}$$

em que:  $Y_{ikl}$ : frequência do alelo  $l$ , dentro do indivíduo  $k$ , dentro da população  $i$ ;  $m$ : média geral da frequência alélica;  $p_i$ : efeito aleatório da população  $i$ , com  $i = 1, 2, \dots, a$ ;  $b_{k(i)}$ : efeito do indivíduo  $k$ , dentro da população  $i$ , com  $k = 1, 2, \dots, b_i$ ;  $g_{l(ik)}$ : efeito do gene  $l$ , dentro do indivíduo  $k$ , dentro da população  $i$ , com  $l = 1, 2, \dots, n_{ik}$ . Os parâmetros genéticos estimados foram:  $\bar{\theta}_p$  = divergência genética entre populações ou coeficiente de coancestria entre árvores dentro de populações;  $\bar{F}$  = índice de fixação médio para o conjunto das populações;  $\bar{f}$  = índice de fixação médio dentro das populações.

O segundo modelo foi utilizado para verificar a possível existência de estruturação genética dentro das populações, ou em outros termos, a presença de estruturas de famílias dentro das populações, na qual foi baseado na hierarquia de genes dentro de indivíduos, dentro de grupos e dentro de populações. Assim, foi adicionado um efeito a mais no modelo, o efeito de "grupos de famílias". O modelo estatístico para essa análise hierárquica foi:

$$Y_{zkl} = m + p_i + f_{z(i)} + b_{k(iz)} + g_{l(zik)}$$

em que:  $Y_{zkl}$ : frequência do alelo  $l$ , dentro do indivíduo  $k$ , dentro do grupo  $z$ , dentro da população  $i$ ;  $m$ : média geral da frequência alélica;  $p_i$ : efeito aleatório da população  $i$ , com  $i=1, 2, \dots, e$ ;  $f_{z(i)}$ : efeito aleatório do grupo  $z$ , dentro da população  $i$ , com  $z=1, 2, \dots, a_i$ ;  $b_{k(iz)}$ : efeito aleatório do indivíduo  $k$ , dentro do grupo  $z$ , dentro da população  $i$ ; com  $k=1, 2, \dots, b_i$ ;  $g_{l(zik)}$ : efeito do alelo  $l$ , dentro do indivíduo  $k$ , dentro do grupo  $z$ , dentro da população  $i$ , com  $l=1, 2, \dots, n_{zk}$ . Os parâmetros genéticos estimados foram:  $\hat{\theta}_p$  =divergência genética entre populações;  $\bar{\theta}_{G(P)}$  =divergência genética entre grupos dentro populações;  $\bar{F}$  =índice de fixação médio para o conjunto das populações;  $\bar{f}$  =índice de fixação médio entre populações.

Para verificar-se as estimativas médias de  $\bar{\theta}_p$ ,  $\bar{\theta}_{G(P)}$ ,  $\bar{F}$  e  $\bar{f}$  são estatisticamente diferentes de zero, o intervalo de confiança a 95% e a 99% de probabilidade foi estimado pelo método de reamostragem *bootstrap*. As análises de variâncias, descritas acima e os *bootstraps* foram calculados usando o programa GDA de Lewis & Zaykin (1999).

### 3.4.4 Fluxo gênico

O fluxo gênico aparente ( $\bar{Nm}$ ) entre populações foi estimado de forma indireta, segundo modelo de ilhas proposto por Crow e Aoki (1984), o qual corrige a análise para pequeno número de populações:  $\bar{Nm} = (1/4\alpha)[(1/\bar{F}_{ST}) - 1]$ , em que,  $\bar{Nm}$  corresponde ao número de migrantes por geração,  $\bar{F}_{ST}$  a divergência genética entre populações e  $\alpha$  a

correção para o número de populações ( $n$ ), sendo:  $\alpha = [n / (n - 1)]^2$ . Substituiu-se  $\bar{F}_{ST}$  por  $\bar{\theta}_p$  conforme sugerem Cockerham e Weir (1984), para uma estimação de fluxo gênico não viesada.

### 3.4.5 Autocorrelação espacial

Para a análise de autocorrelação espacial utilizaram-se todos os locos, incluindo os locos *Pgi-1*, *Lap-1* e *Pgm-2*, na qual procurou-se verificar a extensão da estrutura espacial, quando presente. A análise de autocorrelação genética espacial foi realizada dentro das populações. Todos os possíveis pares de combinações de árvores foram considerados como um conjunto e foram acessados para uma das oito a 10 classes de distância geradas nas populações. A extensão das classes de distância foram selecionadas equalizando o número total de cada conjunto de pares de comparações. Foram calculados os valores do índice  $I$  de Moran (Sokal e Oden, 1978) para cada uma das classes de distância, em cada loco e para a média dos locos pela expressão:

$$\bar{I} = n \sum_i \sum_j w_{ij} Z_i Z_j / W \sum_i Z_i^2 ,$$

em que:  $w_{ij}=1$  para todas as células  $i$  e  $j$  localizadas em uma classe de distância ( $r$ ,  $r+\Delta r$ ), e do contrário  $w_{ij} = 0$ ;  $W$  é a soma de todos os pesos (contagem de todos os pares usados em todos os casos); e  $Z_i$  é o desvio da frequência alélica da  $i$ -ésima célula da média. O valor esperado de  $I = -1/(n-1)$  aproxima-se de zero para valores elevados de  $n$ . Os valores estimados do índice  $I$  de Moran foram usados para testar a significância dos desvios dos valores esperados,  $E(I) = -1/(n-1)$ , sobre a hipótese de nulidade de distribuição aleatória (Cliff e Ord, 1981). A significância total de cada correlograma foi testada usando critérios de Bonferroni (Sokal e Oden, 1983). As análises de autocorrelação espacial e os teste foram realizado utilizando-se o programa SGS (Degen, 2003).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 Sistemas isoenzimáticos e herança**

Em prévio estudo do sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética de *T. cassinoides*, foram revelados 12 locos polimórficos em oito sistemas (PGI, PGM, MDH, PO, EST, IDH, 6PGDH e SKDH) isoenzimáticos (Sebbenn et al., 2000; 2001).

No presente trabalho, foram genotipados indivíduos adultos e interpretados 10 locos em 8 sistemas isoenzimáticos. Contudo, nem todos esses locos puderam ser analisados, devido a dificuldade encontrada na revelação dos géis. Todos os dez locos avaliados em *T. cassinoides* apresentaram polimorfismo (Figura 2). Os sistemas MDH e PGI apresentaram dois locos passíveis de interpretação e os demais (PGM, LAP, IDH, SKDH, EST e 6PGDH) apresentaram apenas um loco. Contudo, os locos *Pgi-1*, *Lap-1* e *Pgm-2*, foram excluídos de parte das análises (estrutura genética) devido a não possibilidade de sua correta interpretação em todas as populações.

O sistema isoenzimático MDH, de expressão dimérica, apresentou dois locos, sendo ambos polimórficos, segregando três alelos em cada loco. O sistema PGI apresentou dois locos polimórficos de expressão dimérica, sendo que o loco *Pgi-1* segregou três alelos em cada. O sistema PGM apresentou um loco, *Pgm-2*, de expressão dimérica, contendo três alelos. Porém, esse loco não foi revelado para as populações JNA1, JNA2 e RMA1. Os sistemas LAP, IDH, SKDH e EST apresentaram apenas um loco, todos de expressão monomérica, segregando dois alelos no loco *Lap-1*, três alelos nos locos *Idh-1* e *Skdh-1* e quatro no loco *Est-1*. O sistema 6PGDH apresentou o loco *6Pgdh-2*, de expressão dimérica, com três alelos.

## 4.2 Frequências alélicas

A estimativa das frequências alélicas para as populações são apresentadas na Tabela 2. Foram detectados vários alelos raros e exclusivos nas populações de *T. cassinoides*. No loco *Mdh-1* o alelo três encontra-se somente em uma população natural JNA4 e em baixa frequência (0,018). Para o loco *Mdh-2*, verifica-se também sua ocorrência em duas populações naturais e em baixa frequência na JNA2 (0,014) e na JNA4 (0,009). O loco *Pgi-1* apresentou um alelo raro nas populações natural JNA4 (0,018) e manejadas CMA (0,020) e RMA2 (0,018). Contudo, este loco não foi revelado para a população da JNA1, de forma que não é possível conhecer a distribuição das frequências alélicas nessa população. Ainda, observou-se na população RMA2 que o alelo 2 também apresentava baixa frequência (0,009), diferente das demais populações onde esse alelo apresentava frequência comum. No loco *Pgm-2* o alelo 1 encontra-se em alta frequência para a população RMA2 (0,930), o alelo 3 ausenta-se da população CMA e ocorre em baixa frequência nas populações JNA4 (0,021) e RMA2 (0,018) e em média frequência na população JNA3. No loco *Idh-1*, detectou-se que o alelo 3 era exclusivo das populações da JNA1 (0,173) e JNA2 (0,273) e o alelo 1 encontra-se em alta frequência na população RMA2 (0,923) e na JNA4 (0,875). No loco *Skdh-1* o alelo 3 encontra-se apenas na população JUN4 (0,031) e em baixa frequência. O alelo 1 encontra-se em elevada frequência, nas mesmas populações JUN4 (0,760) e RMA2 (0,759). O loco *Est-1* o alelo 4 ocorreu apenas na população JNA4 (0,027) e em baixa frequência. No loco *6Pgdh-2* o alelo 1 encontrava-se em alta frequência na população RMA2 (0,930), observando-se baixa frequência para o alelo 3 na mesma população. Em relação aos demais alelos, observou-se que o alelo mais comum em uma população nem sempre era o mais comum em outra. Por exemplo, no loco *Mdh-1*, alelo 2 era o de maior frequência na população JNA1 e CMA, enquanto o alelo 1 era o mais frequente nas demais. Nos demais locos é possível observar o mesmo padrão de distribuição dos alelos nas populações, com o mesmo alelo mais comum em algumas populações e outros alelos em outras populações. Isto indica que existem diferenças genéticas entre as populações.

Tabela 2. Estimativa das frequências alélicas em populações de *T. cassinoides*

Loco	Amostra/ alelos	JNA1	JNA2	JNA3	JNA4	CMA	RMA1	RMA2
<i>Mdh-1</i>	(n)	50	34	54	56	28	58	57
	1	0,420	0,603	0,657	0,589	0,214	0,612	0,667
	2	0,580	0,397	0,343	0,393	0,786	0,388	0,333
	3	0	0	0	0,018	0	0	0
<i>Mdh-2</i>	(n)	60	36	39	56	26	52	57
	1	0,500	0,528	0,641	0,777	0,250	0,500	0,947
	2	0,500	0,458	0,359	0,214	0,750	0,500	0,053
	3	0	0,014	0	0,009	0	0	0
<i>Pgi-1</i>	(n)	---	94	56	56	50	55	57
	1	---	0,410	0,571	0,786	0,740	0,645	0,974
	2	---	0,590	0,429	0,196	0,240	0,355	0,009
	3	---	0	0	0,018	0,020	0	0,018
<i>Pgi-2</i>	(n)	57	76	54	44	59	56	56
	1	0,763	0,171	0,157	0,580	0,356	0,152	0,777
	2	0,237	0,658	0,491	0,398	0,644	0,688	0,223
	3	0	0,171	0,352	0,023	0	0,161	0
<i>Pgm-2</i>	(n)	---	---	55	47	44	---	57
	1	---	---	0,282	0,691	0,670	---	0,930
	2	---	---	0,282	0,287	0,330	---	0,053
	3	---	---	0,436	0,021	0	---	0,018
<i>Lap1</i>	(n)	57	99	55	---	59	---	58
	1	0,596	0,308	0,418	---	0,203	---	0,233
	2	0,404	0,692	0,582	---	0,797	---	0,767
<i>Idh-1</i>	(n)	52	99	53	56	58	46	52
	1	0,154	0,293	0,528	0,875	0,328	0,315	0,923
	2	0,673	0,434	0,472	0,125	0,672	0,685	0,077
	3	0,173	0,273	0	0	0	0	0
<i>Skdh-1</i>	(n)	54	44	52	48	58	51	56
	1	0,426	0,534	0,529	0,760	0,328	0,402	0,769
	2	0,574	0,466	0,471	0,208	0,672	0,598	0,231
	3	0	0	0	0,031	0	0	0
<i>Est-1</i>	(n)	48	32	50	56	40	51	57
	1	0,125	0,078	0,050	0,446	0,425	0,412	0,719
	2	0,667	0,703	0,790	0,455	0,575	0,588	0,211
	3	0,208	0,219	0,160	0,071	0	0	0,070
	4	0	0	0	0,027	0	0	0
<i>6pgdh-2</i>	(n)	60	97	55	47	50	59	57
	1	0,450	0,258	0,327	0,691	0,480	0,263	0,930
	2	0,383	0,577	0,391	0,287	0,490	0,593	0,053
	3	0,167	0,165	0,282	0,021	0,030	0,144	0,018

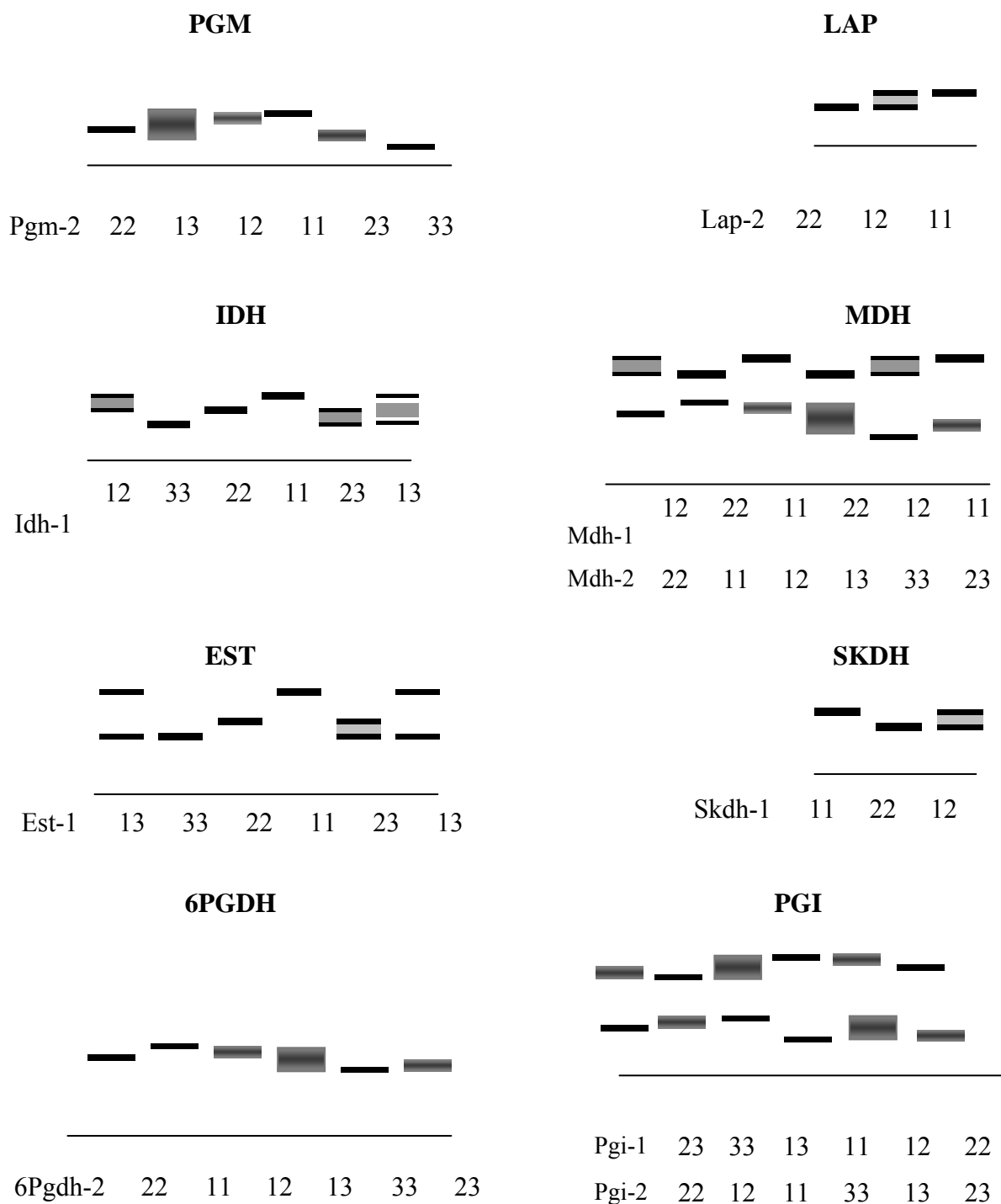


Figura 2 - Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *T.cassinoides* nos sistemas PGM, LAP, IDH, MDH,  $\beta$ -EST, SKDH, 6PGDH e PGI e juntamente com seus respectivos genótipos

### 4.3 Estrutura genética

A distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações de *T. cassinoides* foi avaliada pelas estatísticas  $F$ , usando o método de Weir & Cockerham (1984). Essas estatísticas  $F$  fornecem os índices de fixações de alelos ao nível de média de populações ( $f$ ) e total das populações ( $F$ ) e o coeficiente de coancestria ( $\theta_p$ ) ou a probabilidade de amostrar-se dois alelos ao acaso em dois indivíduos dentro das populações e ambos serem idênticos por descendência (Sebbenn, 1997). Esta estatística também faz referencia a aderência das populações ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores de  $F$  iguais a zero indicam genótipos em EHW, valores positivos indicam excesso de homozigotos e valores negativos indicam excesso de heterozigotos (Wright, 1965). Os resultados das estatísticas  $F$  são dados na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativa das estatísticas  $F$ , usando medidas de Weir & Cockerham (1984), em populações naturais (NA) e manejadas (MA) de *T. cassinoides*. ( $np$ =número de populações;  $\hat{f}$ =índice de fixação médio dentro das populações;  $\hat{F}$ =índice de fixação total das populações;  $\hat{\theta}_p$ =divergência genética entre populações;  $\hat{N}m$ = fluxo gênico)

Amostra <sup>1</sup>	$np$	$\hat{f}$	$\hat{F}$	$\hat{\theta}_p$	$\hat{N}m$
Pop. (NA+MA)	7	0,032ns	0,203**	0,176**	1,59
Pop. NA (Todas)	4	-0,027ns	0,105ns	0,128**	3,83
Pop. MA (Todas)	3	0,119ns	0,369**	0,284**	1,12

\*\* P<0,01. \* P<0,05. ns=não significativo. O erro das estimativas foi obtido pela intervalo de confiança a 99% e 95% de probabilidade, usando reamostragem *bootstrap*. 1=Todas as análises foram realizadas sem os locos *Pgi-1*, *Lap-1* e *Pgm-2*.

As estimativas da divergência genética entre populações ( $\hat{\theta}_p$ ) foram altas e significativamente diferentes de zero para todas as situações, com valores de 0,176 entre todas as populações, 0,128 entre as populações naturais e 0,284 entre as manejadas, encontrados na Tabela 3. A maior divergência genética detectada entre as populações



manejadas sugere que a exploração tenha causado alterações no comportamento genético das populações. O manejo pode aumentar as diferenças genéticas entre populações. A divergência genética entre populações, quando medida por marcadores genéticos neutros, como são as isoenzimas, é causada pelo efeito da deriva genética e pelo isolamento das populações. Assim, a exploração pode ter aumentado as diferenças genéticas entre as populações por deriva genética, causada pela exclusão de parte dos genótipos das populações e/ou pelo isolamento das populações. Por outro lado, as populações naturais amostradas encontram-se localizadas dentro de uma mesma floresta contínua, o que explicaria a menor divergência genética entre elas. As populações manejadas encontram-se fora dessa área, mais ao sul, de forma que as diferenças genéticas possam ser também devido a um isolamento ocorrido no passado e não propriamente devido ao manejo.

O índice de fixação médio dentro das populações ( $\hat{f}$ ) foi negativo nas populações naturais (-0,027) e positivo nas populações manejadas (0,119), embora esses valores não sejam significativamente diferentes de zero, eles indicam excesso de heterozigotos nas populações naturais e de homozigotos nas populações manejadas. O índice de fixação para o conjunto das populações ( $\hat{F}$ ) foi positivo e significativo nas análises que incluem todas as populações, as naturais e as manejadas. Considerando todas as populações o índice  $\hat{F}$  foi de 0,203, considerando somente as naturais foi de 0,105 e considerando somente as manejadas foi de 0,369, embora apenas na análise que incluía todas as populações e na análise das manejadas o índice de fixação tenha sido significativamente diferente de zero.

O índice de fixação ( $\hat{f}$ ) médio dentro das populações é função do sistema de reprodução da população. Já o índice de fixação total ( $\hat{F}$ ) é função dos efeitos da deriva genética, do isolamento das populações, combinado com o sistema de reprodução dentro das populações. A divergência genética entre populações ( $\hat{\theta}_p$ ), medida com base em dados de marcadores neutros é função somente da deriva. Assim, observando os valores de ambos índices de fixação ( $\hat{f}$  e  $\hat{F}$ ) e da medida de divergência genética entre

populações ( $\hat{\theta}_p$ ), é possível concluir que o excesso de homozigotos observados no conjunto das populações naturais mais as manejadas e nas populações manejadas seja devido ao efeito da deriva genética.

#### **4.4 Fluxo gênico**

As medidas de divergência genética entre populações também permitem fazer inferência sobre o fluxo de genes entre populações, desde que algumas pressuposições sejam assumidas, como, por exemplo, de que estas populações apresentam um modelo de ilhas, onde pequenas populações trocam genes aleatoriamente entre si, independente de sua posição geográfica. Aparentemente, esta pressuposição não descreve a situação real, visto que as populações naturais encontram-se localizadas em mesma floresta contínua e um modelo do tipo isolamento por distância possa provavelmente ser o mais adequado. Contudo, assumindo o modelo de ilhas, o qual permite estimar facilmente o fluxo gênico a partir da estimativa da divergência genética entre populações os resultados foram os seguintes. A estimativa do fluxo gênico para o conjunto das populações foi alta ( $>1$ ) em todos os casos. Comparando as populações naturais com as manejadas observa-se que entre as naturais o fluxo gênico é aparentemente maior 3,83 do que entre as manejadas, 1,12 (Tabela 3). Este resultado é coerente com a localização geográfica das populações. As quatro populações naturais estão localizadas dentro do Parque Ecológico da Jureia-Itatins em uma mesma floresta contínua, o que evidentemente favorece a troca gênica entre as populações. As florestas manejadas estão localizadas a parte destas, estando isoladas e mais ao sul, embora a distância entre as populações naturais e manejadas não seja superior a 40 km. Isto também reforça a precedente conclusão de que a causa das grandes diferenças detectada entre as populações seja primariamente devido ao manejo, através do isolamento parcial das populações, e não, devido a fatores evolutivos como o isolamento ou deriva genética.

#### 4.5 Isolamento por distância

A fim de se verificar a associação entre divergência genética e distância geográfica entre populações, realizou-se um teste de Mantel entre a divergência genética medida entre todos os pares de populações e a distância geográfica entre elas (Tabela 4). A hipótese é de isolamento por distância (Wright, 1943), esperando-se que populações mais próximas entre si sejam menos divergentes e populações mais distantes sejam mais divergentes entre si. O teste de mantel revelou uma correlação positiva de 0,124, mas não significativa ( $P=0,287$ ). Assim, os resultados sugerem que a hipótese de isolamento seja verdadeira, embora o teste estatístico não suporte a tendência observada. Portanto, não é possível atribuir a divergência genética detectada entre as populações a distância geográfica entre elas. Por outro lado, a divergência genética detectada entre as populações pode estar associada ao processo de exploração.

Tabela 4. Matrizes de divergência genética e distância geográfica (km) entre pares de populações

Pop	JNA1	JNA2	JNA3	JNA4	CMA1	RMA1	RMA2
JNA1	--	0,097**	0,118**	0,160**	0,071*	0,245**	0,404**
JNA2	11	--	0,094**	0,116**	0,113**	0,195**	0,324**
JNA3	2	13	--	0,029*	0,037ns	0,174**	0,339**
JNA4	12	14	1	--	0,057**	0,146**	0,312**
CMA1	38	27	40	41	--	0,199**	0,356**
RMA1	40	29	42	43	2	--	0,064**

Coefficiente de correlação = 0,124,  $P=0,287$ , para 5.000 permutações.

\*\*  $P<0,01$ . \*  $P<0,05$ . ns= não significativo

#### 4.6 Distribuição espacial dos genótipos

A estrutura genética espacial dos genótipos, amostrados de forma estruturada (Anexos B, C, D, E e F), das populações de *T. cassinoides* foi estudada por análise de variância de frequências gênicas, usando amostras hierárquicas de indivíduos dentro de

grupos e grupos dentro de populações (Tabela 5), sendo que cada grupo foi constituído pelas cinco árvores vizinhas entre si, e por análise de autocorrelação espacial, usando o índice  $I$  de Moran (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7).

A análise da distribuição espacial dos genótipos indicou forte estruturação nas populações de *T. cassinoides*. A divergência genética entre grupos ( $\hat{\theta}_{sp}$ ) mede a diferença entre grupos a partir do coeficiente de coancestria entre árvores dentro de populações, ou em outros termos, pela probabilidade de amostrar-se dois alelos em dois indivíduos de um mesmo grupo e eles serem idênticos por descendência. Portanto, mede a divergência entre os grupos pelo parentesco existente dentro dos grupos. As estimativas do coeficiente de coancestria entre indivíduos do mesmo grupo foram altas e significativas em todas as análises, com valores variando de 0,097 no conjunto das populações manejadas a 0,123 nas populações naturais. Isto indica que a coancestria entre árvores dentro dos grupos aproxima-se do esperado em estrutura de progênie de meios-irmãos 0,125. Dessa forma, pode-se afirmar que as populações de *T. cassinoides* avaliadas por amostragem estruturada, encontram-se fortemente estruturadas no espaço, em termos genéticos. O alto parentesco entre árvores próximas indica que a dispersão de sementes e o recrutamento ocorrem nas vizinhanças da árvore matriz. Como consequência pode-se esperar a ocorrência de cruzamento entre parentes nas populações e a geração de endogamia biparental, adicionalmente a autofecundação. Em concordância com esta hipótese, um estudo prévio do sistema de reprodução em uma população natural da Juréia revelou que a *T. cassinoides* é uma espécie de sistema misto de reprodução, combinando cruzamentos 0,895 com autofecundações 0,105 e que 17,5% das sementes eram produzidas pelo cruzamento entre indivíduos parentes (Sebbenn et al., 2001). Por outro lado, Murawski et al. (1994) observaram maior taxa de cruzamento entre indivíduos parentes, em uma população manejada 0,062 em comparação a uma natural 0,017 de *Shorea curtisi*, atribuindo o fato à possibilidade de que em populações manejadas indivíduos próximos possam ser menos parentes entre si do que populações não manejadas.

A *T. cassinoides* muitas vezes propaga-se por raízes gemíferas de forma a gerar populações formadas por clones, o que naturalmente favorece a ocorrência de estruturação genética espacial e de parentesco nas populações. Contudo, durante o processo de amostragem, tomou-se o cuidado de não amostrar-se indivíduos clones. Ainda, caso a amostra tivesse incluído tais clones, o coeficiente de coancestria deveria assumir valores próximo a 0,5, o que não é o caso em nenhuma das populações.

Outro fato interessante é que as populações manejadas apresentaram menor coeficiente de coancestria 0,097 do que a média das populações naturais 0,123. A causa pode ser atribuída, provavelmente, ao manejo ou, em outros termos, a retirada de genótipos nas populações. Assim, muitos dos indivíduos parentes poderiam ser excluídos. Sebbenn et al. (2000) comparando o sistema de reprodução na população RMA1 com a JNA4 observou maior taxa de cruzamento entre parentes na população natural (17,5%), relativamente a população manejada (9,2%). Os autores atribuíram a maior proporção de cruzamentos entre parentes na população natural e a possível estruturação genética espacial, o que o presente trabalho está confirmando. Embora, este seja um aspecto positivo do manejo, visto que o cruzamento entre parentes é uma das duas formas de geração de endogamia em espécies hermafroditas auto-incompatíveis como *T. cassinoides*, os autores detectaram que a taxa de autofecundação foi maior na população manejada (21,7%) em comparação à natural (10,5%), atribuindo o fenômeno ao aumento da distância espacial entre os indivíduos dentro das populações. Estudos do sistema de reprodução em espécies arbóreas, comparando diferentes densidades de florescimento e indivíduos por população têm detectado a tendência de populações como menos densidade de flores (Murawski & Hamrick, 1991) e menor densidade populacional (Fuchs et al., 2002) de apresentarem maior taxa de autofecundação, o que é, em termos genéticos mais drástico para geração de endogamia do que o cruzamento entre parentes. A autofecundação aumenta a endogamia em 50% a cada geração, enquanto que o cruzamento entre parentes aumenta a endogamia em proporção igual a coancestria entre os indivíduos que estão se cruzando. Por exemplo, a endogamia gerada na descendência do cruzamento entre dois indivíduos meios-irmãos é 12,5% e do

cruzamento de dois irmãos-completos é de 25% e da autofecundação de uma planta de 50%.

Tabela 5. Estimativa das estatísticas  $F$ , usando medidas de Weir & Cockerham (1984), em populações naturais (NA) e manejadas (MA), por meio de amostras estruturadas em *T. cassinoides*. ( $np$ =número de populações;  $nsp$ =número de sub-populações;  $\hat{f}$ =índice de fixação médio dentro das populações;  $\hat{F}$ =índice de fixação total das populações;  $\hat{\theta}_{sp}$ =divergência genética entre grupos dentro de populações)

Amostra <sup>1</sup>	$np(nsp)$	$\hat{f}$	$\hat{F}$	$\hat{\theta}_{sp}$
Grupo/pop (NA+MA)	5(68)	0,046ns	0,161**	0,120**
Grupo/pop (NA)	3(44)	-0,022ns	0,103**	0,123**
JNA1	(12)	-0,166**	-0,159**	0,007ns
JNA2	(20)	0,049ns	0,134ns	0,089ns
JNA3	(12)	0,074ns	0,077ns	0,003ns
Grupo/pop (MA)	2(24)	0,151ns	0,234**	0,097*
CMA	(12)	0,144ns	0,330**	0,217**
RMA2	(12)	0,157ns	0,136ns	-0,024*

\*\*  $P < 0,01$ . \*  $P < 0,05$ . ns=não significativo. O erro das estimativas foi obtido pelo intervalo de confiança a 99% e 95% de probabilidade, usando 10.000 reamostragem *bootstrap*. 1= Todas as análises foram realizadas sem os locos *Pgi-1*, *Lap-1* e *Pgm-2*.

A forte estruturação genética espacial também ficou evidenciada no cálculo do índice  $I$  de Moran na população Cindomel (CMA) manejada e descrita no correlograma da Figura 7, onde se verifica que árvores localizadas até a distância de aproximadamente 50 m apresentaram valores altos e significativos para o referido índice, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade. O índice  $I$  de Moran assumiu valores positivos e significativos até a classe de distância de 50 m, valores próximos a zero entre 50m a 130m e valores negativos e significativos a partir de 180 m, sugerindo que

árvores próximas seriam parentes entre si e árvores distantes seriam diferentes entre si, em termos genéticos. A forte estruturação detectada na população Cindomel (CMA) também ficou evidente na análise da estrutura intrapopulacional dessa população, onde se detectou que a divergência genética entre subpopulações era de 0,217, a mais alta detectada nesse estudo (Tabela 5). Assim, interpretando a medida de divergência como um coeficiente de coancestria, verifica-se que o parentesco dentro das subpopulações encontra-se entre o esperado em progênies de meios-irmãos (0,125) e irmãos-completos (0,250), sendo mais próximo ao último. Conseqüentemente, pode-se esperar o aparecimento de endogamia biparental na descendência dessa população de aproximadamente 0,217 a cada geração. Observando o índice de fixação para o total dessa população ( $\hat{F}$ ), já é possível observar forte e significativa endogamia (0,330) e como conseqüência pode-se esperar a ocorrência de depressão por endogamia. Segundo Allard (1971), em populações de espécies alógamas, como o caso de *T. cassinoides*, onde todas as plantas são altamente heterozigotas e a presença de endogamia levará a uma deterioração geral do vigor, bem como o aparecimento de efeitos adversos como a perda de fertilidade, adaptação, produtividade, etc, fenômenos conhecidos por depressão endogâmica.

Por outro lado, nas populações JNA1, JNA3 e RMA2 (Figuras 3, 5 e 6) não foram detectados indícios de estruturação genética espacial, a partir do índice  $I$  de Moran. Em concordância, a análise da estruturação genética dentro dessas populações também não detectou indícios de estruturação genética e menores problemas de origem genética podem ser esperados para essas populações. Na população JNA2 (Figura 4) foi detectado estrutura genética espacial até a distância de aproximadamente 60 m, sugerindo que árvores localizadas espacialmente próximas apresentam algum grau de parentesco entre si e que existe a possibilidade de ser gerada endogamia biparental nesta população. Esse resultado confirma em parte o observado pela análise de estrutura espacial obtida a partir das estatísticas  $F$ , onde foi detectado um coeficiente de coancestria de 0,089, embora este valor não seja estatisticamente significativo.

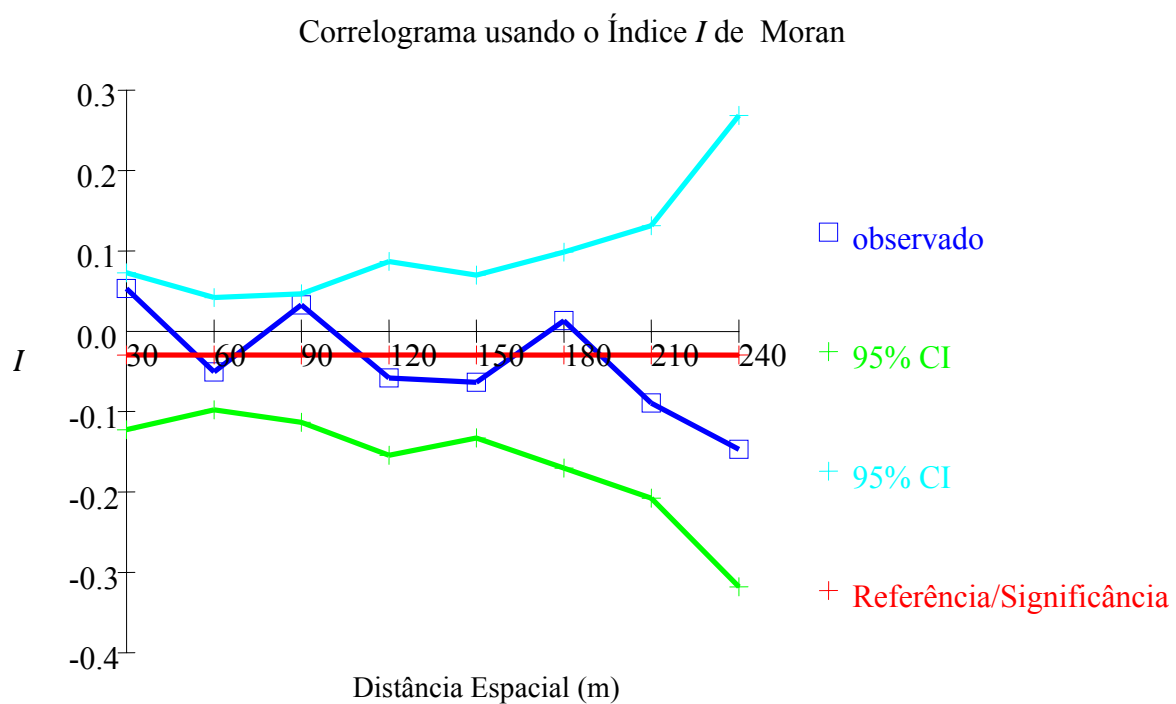


Figura 3. Correlograma do índice  $I$  de Moran para sete classes de distância na população JNA1 natural de *T. cassinoides* na região de Iguape



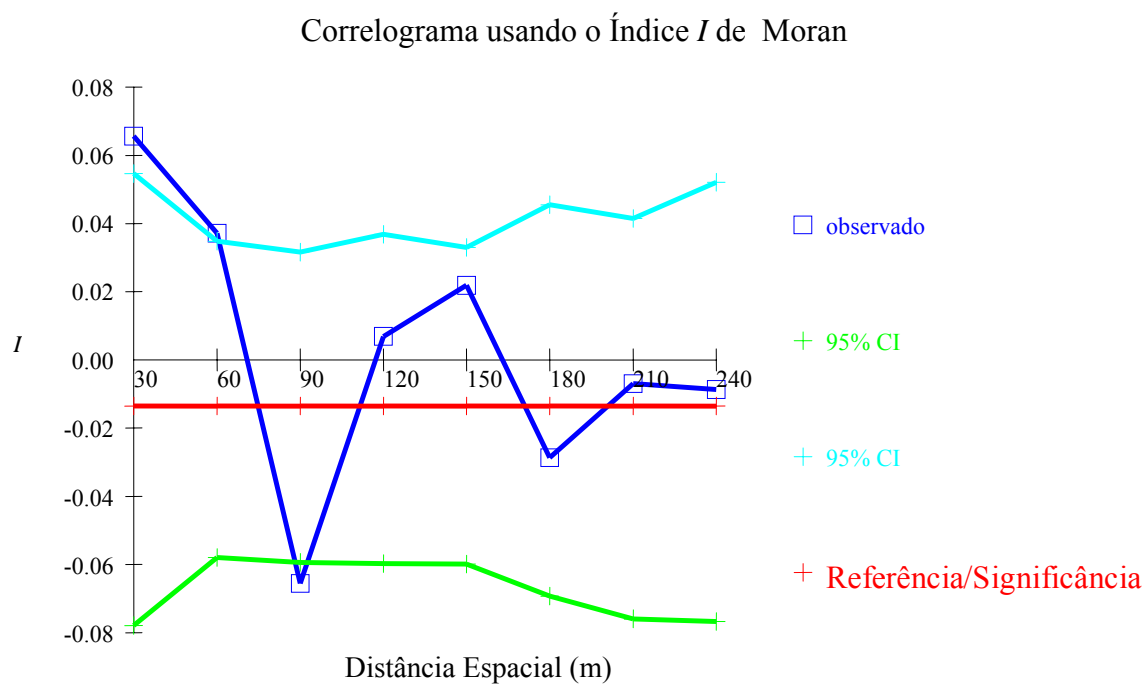


Figura 4. Correlograma do índice  $I$  de Moran para 10 classes de distância na população JNA2 natural *T. cassinoides* na região de Iguape

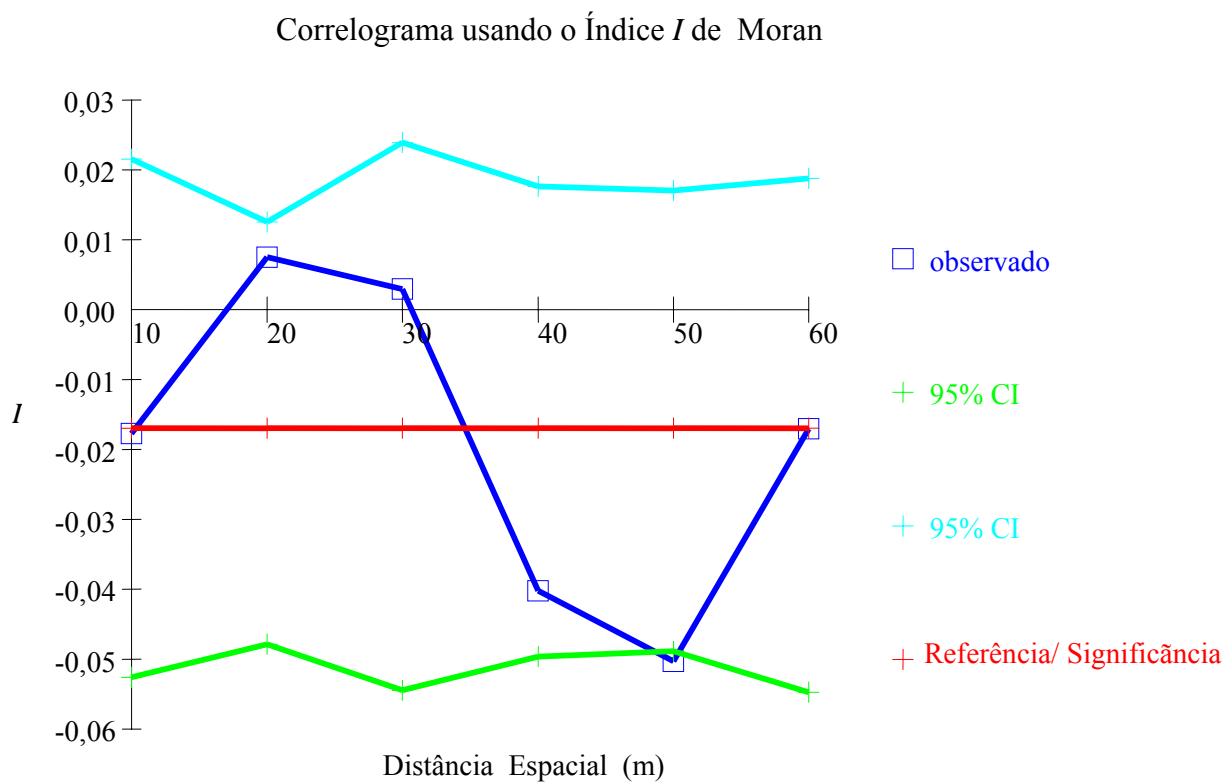


Figura 5 - Correlograma do índice  $I$  de Moran para sete classes de distância na população JNA3 natural *T. cassinoides* na região de Iguape

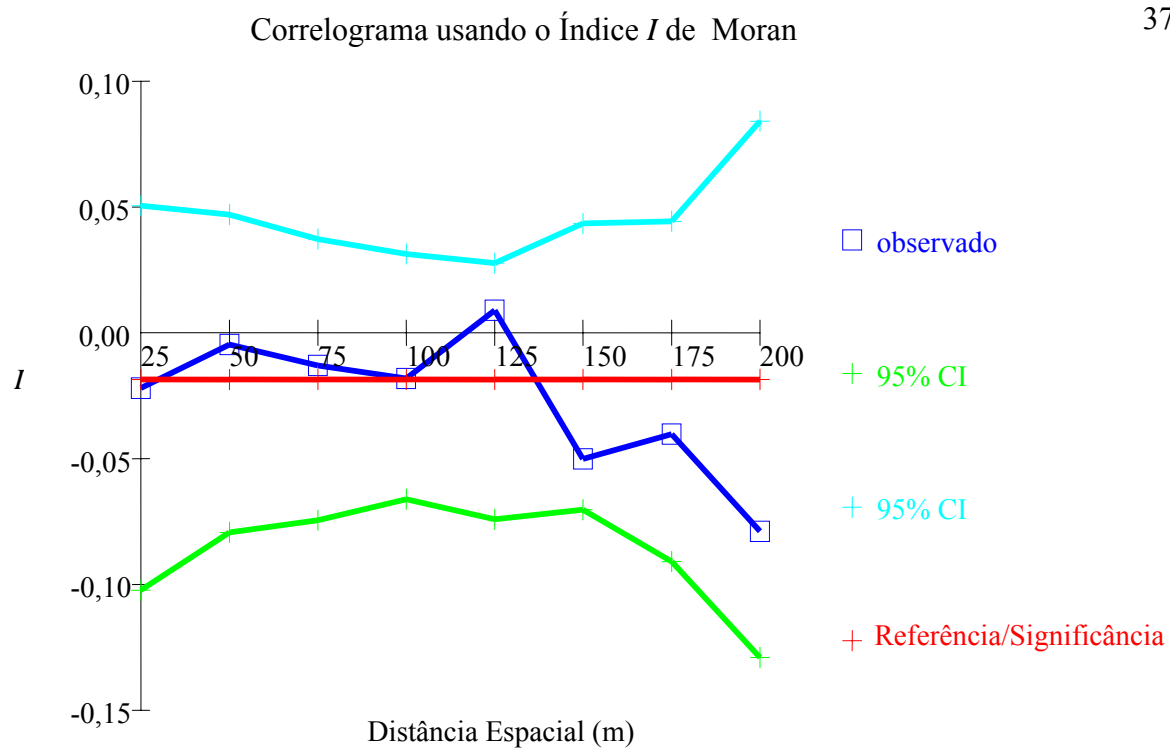


Figura 6 - Correlograma do índice  $I$  de Moran para sete classes de distância na população Retiro (RMA2) manejada *T. cassinoides* na região de Iguape

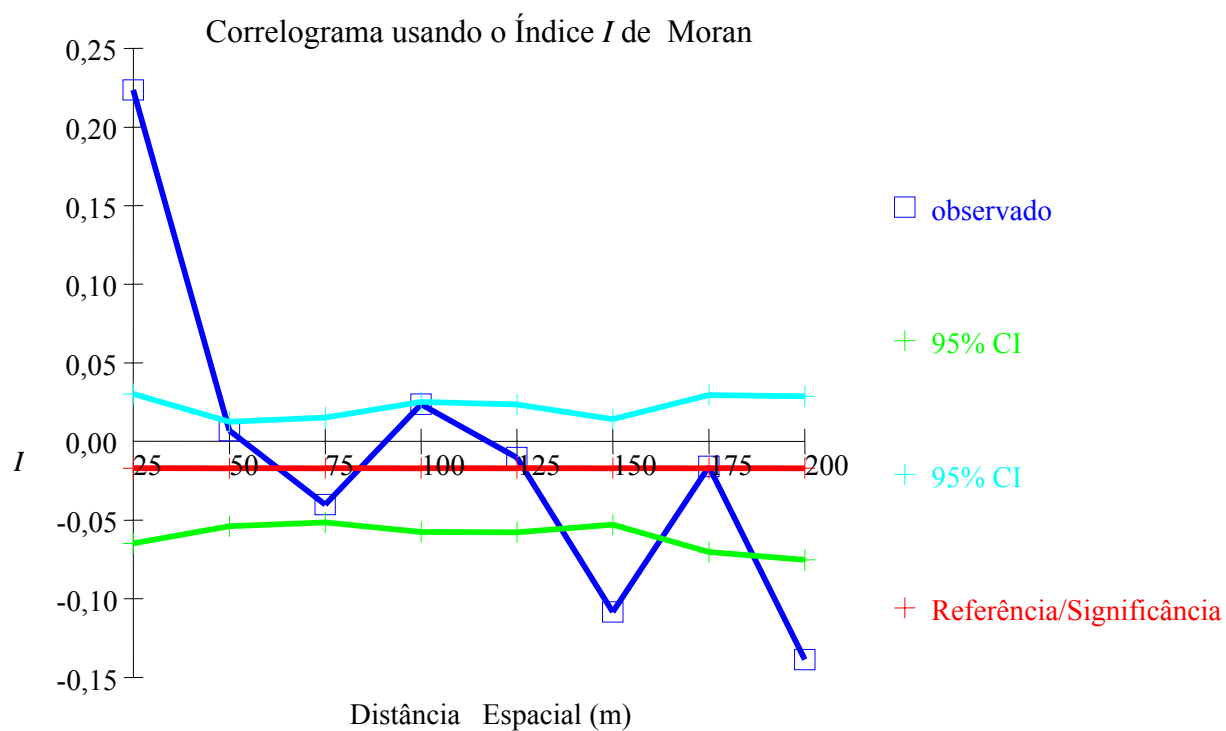


Figura 7 - Correlograma do índice  $I$  de Moran para sete classes de distância na população Cindomel (CMA) manejada *T. cassinoides* na região de Iguape

#### 4.7 Diversidade genética

A estimativa dos índices de diversidade genética mostraram que *T. cassinoides* apresenta altos níveis de variabilidade genética (Tabela 6), comparada a outras espécies de plantas. Para a média das populações, a porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}_{95\%}$ ) foi de 100%, o número médio de alelos por locos ( $\hat{A}$ ) foi de 3,14, a heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_e$ ) foi de 0,455 e a heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) foi de 0,445. Comparando-se estes resultados com os descritos por Hamrick & Godt (1990) para espécies de ampla distribuição geográfica ( $\hat{P}_{95\%}=41,8\%$ ;  $\hat{A}=1,54$ ;  $\hat{H}_e=0,177$ ), espécies tropicais ( $\hat{P}_{95\%}=58,9\%$ ;  $\hat{A}=2,29$ ;  $\hat{H}_e=0,202$ ), espécies de sistema misto de reprodução e polinização animal ( $\hat{P}_{95\%}=49,2\%$ ;  $\hat{A}=1,89$ ;  $\hat{H}_e=0,148$ ) e estágio sucessional inicial ( $\hat{P}_{95\%}=40,0\%$ ;  $\hat{A}=1,68$ ;  $\hat{H}_e=0,120$ ), verifica-se que a *T. cassinoides* apresenta altos índices de variabilidade genética. Em termos de espécies arbóreas tropicais brasileiras, em *Cedrela fissilis* foi detectada heterozigosidade esperada de 0,222 (Gandara, 1996), em *Euterpes edulis* foram detectados valores variando de 0,388 a 0,570 (Reis, 1996), em *Couratari multiflora* e *C. guianensis*, foram detectadas heterozigosidades variando de 0,359 e 0,203 respectivamente (Lepsch-Cunha, 1996), em *Myracrodruon urundeuva* foi relatado heterozigosidade de 0,076 para as populações situadas na Estação Ecológica de Serido e 0,121 no Sitio Mata dos Alves (Lacerda, 1998). Ainda, Hamrick & Murawiski (1991) encontraram valores de heterozigosidade esperada de 0,124 para 16 espécies arbóreas tropicais raras, e compararam com valores obtidos por outras 16 espécies comuns, sendo que estas últimas apresentaram valores superiores, ressaltando a relação da baixa diversidade das espécies raras promovida por um reduzido tamanho efetivo. A alta diversidade genética detectada em *T. cassinoides* pode refletir sua ampla distribuição geográfica 08°S (PE) a 26°30'S (Garuva, SC) e alta densidade populacional e, provavelmente alto grau de fluxo gênico. Espera-se que espécies que ocupam grandes extensões geográficas apresentem maior diversidade genética, devido aos diferentes ambientes que colonizam. Adicionalmente, a alta densidade populacional favorece a

maior diversidade genética, devido ao maior tamanho populacional aumentar a probabilidade de novos alelos serem criados por mutação.

Tabela 6. Estimativa de índices de diversidade genética em populações naturais (JNA1, JNA2, JNA3, JNA4) e manejadas (CMA, RMA1, RMA2) de *T. cassinoides*. ( $n$ =tamanho amostral;  $\hat{A}$ =número médio de alelos por locos;  $\hat{P}_{95\%}$ =porcentagem de locos polimórficos;  $\hat{H}_e$ =heterozigosidade esperada em EHW;  $\hat{H}_o$ =heterozigosidade observada;  $\hat{f}$ =índice de fixação)

População <sup>1</sup>	$n$	$\hat{P}_{95\%}$	$\hat{A}$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$
JNA1	60	100	2,43 (0,20)	0,498 (0,029)	0,576 (0,043)	-0,159**
JNA2	99	100	2,71 (0,18)	0,530 (0,025)	0,548 (0,035)	-0,039ns
JNA3	56	100	2,43 (0,20)	0,505 (0,040)	0,471 (0,042)	0,072ns
JNA4	57	100	3,00 (0,22)	0,429 (0,046)	0,421 (0,050)	0,047ns
Média	54	100	2,64 (0,14)	0,491 (0,021)	0,504(0,035)	0,105ns
CMA	59	100	2,14 (0,14)	0,444 (0,024)	0,344 (0,036)	0,188*
RMA1	59	100	2,29 (0,18)	0,492 (0,014)	0,428 (0,066)	0,116ns
RMA2	57	100	2,43 (0,20)	0,284 (0,058)	0,285 (0,062)	-0,009ns
Média	52	100	2,29 (0,08)	0,406 (0,063)	0,353 (0,041)	0,369**
Todas pop.	54	100	3,14 (0,11)	0,455 (0,032)	0,445 (0,039)	0,203**

\*\* P<0,01; \*P<0,05. 1=análises realizadas sem os locos *Pgi-1*, *Lap-1* e *Pgm-2*.

Comparando os níveis de diversidade genética entre as populações (naturais e manejadas) de *T. cassinoides* verifica-se que a porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}_{95\%}$ ), o número médio de alelos por locos ( $\hat{A}$ ), a heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e a esperada ( $\hat{H}_e$ ) foram elevados para todas as populações. Todas as populações apresentaram 100% de locos polimórficos. O menor número médio de alelos por locos foi detectado na população CMA (2,14) e o maior na população JNA4 (3,0); a menor

heterozigosidade esperada foi detectada na população RMA2 (0,284) e a maior na JNA2 (0,530); a menor heterozigosidade observada foi detectada na população RMA2 (0,285) e a maior na JNA1 (0,576); o menor índice de fixação foi detectado na população JNA1 (-0,159) e o maior foi na CMA (0,188). Estes resultados claramente sugerem que as populações naturais apresentam maiores níveis de diversidade genética e menor de endogamia, relativamente às populações manejadas. Esta hipótese também é evidente quando observa-se os valores médios para o agrupamento das populações manejadas e naturais. Por exemplo, o número médio de alelos por locos para a média das populações naturais foi de 2,64 e para a média das manejadas foi de 2,29; a heterozigosidade esperada foi de 0,491 para as populações naturais e de 0,406 para as manejadas; a heterozigosidade observada foi de 0,504 para as populações naturais e de 0,353 para as manejadas; o índice de fixação foi de 0,105 para as populações naturais e de 0,369 para as manejadas. Ainda, observado o erro padrão desses parâmetros observa-se que o número médio de alelos por locos, a heterozigosidade esperada e a observada são estatisticamente diferentes entre a média do grupo das populações naturais em relação às manejadas. Em relação ao índice de fixação, na média das populações naturais os resultados indicam ausência de endogamia (0,005), observando-se que este valor não é estatisticamente diferente de zero. Na média das populações manejadas os resultados indicam endogamia significativamente diferentes de zero (0,369), sendo que estas diferenças podem ter sido causadas pelo processo de exploração das populações.

Sebbenn et al., (2001) comparando os níveis de diversidade genética entre uma população natural e uma manejada também encontrou maior porcentagem de locos polimórficos e número médio de alelos por loco na população natural, e menores heterozigosidades observadas e esperadas na natural, embora elas não fossem estatisticamente diferentes entre si. A retirada de indivíduos nas populações pode, dependendo de sua magnitude, alterar os níveis de diversidade genética. O número médio de alelos por loco é provavelmente o parâmetro genético mais afetado pelo processo de exploração, visto que alelos raros são mais susceptíveis a amostragem do que alelos comuns. Os demais parâmetros também podem ser afetados, contudo, provavelmente em menor escala. Por exemplo, a heterozigosidade esperada depende

principalmente da frequência dos alelos comuns, os quais podem ser retidos em pequenas amostras, considerando que a espécie é diplóide e cada indivíduo amostrado contribui com dois alelos para a amostra final. Em outros termos, amostrando 30 indivíduos, tem-se 60 alelos ( $2n$ ) para o cálculo da heterozigosidade esperada. Em termos gerais, as diferenças entre as populações naturais e manejadas podem ser atribuídas à deriva genética, causada principalmente pelo processo natural de evolução e pelo processo de exploração.

#### 4.8 Índices de diversidade por classe de crescimento e intensidade de desbaste

Para entender o efeito do manejo na diversidade genética das populações de *T. cassinoides* criou-se uma população de referência agrupando-se as populações JNA2 e JNA3. Nessas o DAP foi calculado do CAP, medido em todas as árvores que tiveram seu genótipo avaliado por eletroforese de isoenzimas. Assim, criou-se cinco diferentes classes diamétricas e estimou-se os parâmetros  $\hat{A}$ ,  $\hat{H}_e$ ,  $\hat{H}_o$  e  $\hat{f}$  para cada classe (Tabela 7).

O número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e a heterozigosidade esperada em EHW ( $\hat{H}_e$ ), aparentemente independem da classe diamétrica (Tabela 7). Os valores oscilaram sem tendência forte para aumento ou diminuição com o aumento das classes diamétricas e com o tamanho amostral ( $n$ ). O coeficiente de correlação de Spearman entre classes diamétricas e número médio de alelos por locos foi de 0,435, embora não tenha sido significativo. O coeficiente de correlação de Spearman entre classes diamétricas e heterozigosidade esperada foi baixo, negativo e não significativo -0,166. Por outro lado, a heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e o índice de fixação ( $\hat{f}$ ) apresentaram indícios de dependência com relação as diferentes classes diamétricas. A heterozigosidade observada apresentou a tendência de aumento com o aumento na classe diamétrica. O índice de fixação, por sua vez, apresentou comportamento oposto ao verificado na heterozigosidade observada com tendência à redução com o aumento nas classes diamétricas. O coeficiente de correlação de Spearman entre as classes diamétricas e a



heterozigosidade observada foi positivo, alto e significativo 0,813, sugerindo que o aumento das classes diamétricas maior tende a maiores valores de heterozigosidade observada. O coeficiente de correlação entre classes diamétricas e o índice de fixação foi negativo, alto e significativamente diferente de zero -0,910, sugerindo que com o aumento das classes diamétricas, há uma tendência de encontrar menores valores do índice de fixação. Este último resultado também sugere a ocorrência de seleção a favor de heterozigotos entre as fases juvenis e fase adulta, se considerarmos árvores com menor DAP como sendo mais jovens do que árvores de maiores DAP. Estes resultados indicam que o manejo visando a retirada de árvores de maior diâmetro reduz os níveis de variabilidade genética, quando esta é medida em termos de heterozigosidade observada. A perda de heterozigosidade com a retirada de árvores com diâmetro acima de 12 cm de DAP foi de aproximadamente 12%. Em termos de endogamia, os resultados indicam que com a retirada de árvores maiores do que 12 cm de DAP tem-se, também a redução nos níveis de heterozigosidade.

Tabela 7. Estimativa de índices de diversidade genética em populações de *T. cassinoides*. ( $n$ =tamanho amostral;  $\hat{A}$ =número médio de alelos por locos;  $\hat{H}_e$ =heterozigosidade esperada em EHW;  $\hat{H}_o$ =heterozigosidade observada;  $\hat{f}$ =índice de fixação)

Intervalo de classe para DAP	$n$	$\hat{A}$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$
<8,0 cm	19	2,44	0,523	0,500	0,046ns
8,0 a 12,0 cm	25	2,44	0,521	0,524	-0,006ns
12,0 a 21,0 cm	47	2,44	0,502	0,465	0,076ns
21,0 a 30,0 cm	22	2,55	0,528	0,549	-0,040ns
> 30,0 cm	8	2,33	0,491	0,594	-0,229ns
Correlação <sup>1</sup> - $\hat{r}$		0,435ns	-0,166ns	0,813ns	-0,910*
Exploração <sup>2</sup>					
>30,0 cm	112	2,55	0,515	0,500	0,028ns
>21,0 cm	90	2,44	0,514	0,490	0,046ns
>12 cm	44	2,44	0,518	0,510	0,015ns

ns= não significativo \* ( $P < 0,05$ ); 1= Correlação de Spearman; 2= Níveis de exploração.

Também estudou-se os efeitos do manejo nos níveis de diversidade genética criando-se três diferentes cenários: a) com a exclusão de árvores maiores do que 30 cm de DAP; b) com a exclusão de árvores com DAP maior do que 21 cm e; c) com a exclusão de árvores com DAP maior do que 12 cm de DAP (Tabela 7). Comparando estes cenários o único efeito observado foi com relação a exclusão de árvores de grandes diâmetros, onde ocorreu uma redução no número médio de alelos por locos de 2,55 para 2,44. Nesse caso, a redução no tamanho da população pode ser a causa da perda de alelos, devido aos mesmos motivos anteriormente discutidos. Nos demais parâmetros, não foi observado nenhum comportamento que esteja aparentemente associado à exploração. O comportamento das heterozigosidades teve leve oscilação entre os diferentes cenários, sem tendência definida.

Adicionalmente, estudou-se os efeitos do tamanho amostral nos níveis de diversidade genética em *T. cassinoides*, simulando a retenção de diferentes tamanhos populacionais em uma área de 1 ha. Para isso, criou-se uma população base de um hectare com 267 indivíduos adultos, usando árvores genotipadas nas populações naturais. Estudos indicam que o número médio de indivíduos de *T. cassinoides* por hectare, nas populações da região de Iguape chega a 324. Assim, a população base é um pouco menor. Dessa população base tirou-se 100 amostras aleatórias, sem reposição, de 20, 30, 50, 75 e 100 indivíduos e estimaram-se os índices de diversidade genética para cada uma das amostras e para a média das 100 amostradas de mesmo tamanho amostral (Tabela 8).

Os resultados para a média das 100 amostras de diferentes tamanhos mostram claramente o efeito da deriva genética nos diferentes parâmetros. Todos os parâmetros apresentam o comportamento de aumento com a utilização de maiores tamanhos amostrais. Também observou-se que com o aumento dos tamanhos amostrais, os valores dos parâmetros tendem a se aproximar dos estimados para a população base. Ainda, observando as estimativas dos desvios padrões associados à média, verifica-se que quanto maior é o tamanho retido nas populações menor é o desvio padrão, portanto, que as amostras tendem a assumir valores menos variáveis em relação a média. A porcentagem de locos polimórficos presentes na população base, em média, só foi

atingida com a retenção de 100 genótipos por hectare. Para o número médio de alelos por locos, heterozigidade esperada e para o índice de fixação, nem com a retenção de 100 genótipos detectou-se o mesmo valor observado na população base. Em relação ao índice de fixação, na realidade o desejado seria obter populações com valores iguais a zero, mas como a população base tinha endogamia, a simulação visava representar o quadro atual, ou seja, representar a população com os mesmos níveis de endogamia. Em relação a heterozigidade observada, observou-se que com a retenção de 50 ou mais genótipos, os níveis foram superiores até aos observados na população base.

A distribuição dos valores dos diferentes parâmetros nas amostras individuais das populações para os diferentes tamanhos amostrais pode ser observada nas Figuras 8 e 9. Verifica-se que o número médio de alelos por locos em amostras de populações com menos de 75 indivíduos, apresenta baixa probabilidade de reter elevado número médio de alelos por locos. Com a retirada de 75 genótipos, detectou-se apenas 5% de populações que reteram o mesmo número de alelos que estavam presentes na população base e com 100 indivíduos, observa-se que aproximadamente 18% das populações apresentavam valores próximos aos valores presentes na população base. Segundo Nei (1975) o número médio de alelos por locos é fortemente afetado pelo efeito da deriva genética, devido aos alelos raros não serem retidos em pequenas amostras. Isto pode ser claramente observado na Tabela 7 e na Figura 6. Com amostras menores do que 30 genótipos ocorre grande oscilação entre populações na heterozigidade esperada (Figura 8), heterozigidade observada e no índice de fixação (Figura 9), sendo que podem ser observadas populações com baixos valores e com altos valores. Por exemplo, para o índice de fixação podem ser detectadas populações com excesso de heterozigotos ( $<0,0$ ; 18%) e com excesso de endogamia ( $>0,25$ ; 10%). Em geral, o que se observa é que com amostras inferiores a 75 genótipos podem ser obtidas grande número de populações com baixos níveis de heterozigidades, enquanto que com amostras de pelo menos 75 genótipos a variação entre populações nos níveis de heterozigidade diminui e as amostras tendem a reter maiores níveis de heterozigidade. Assim, aparentemente, a manutenção de pelo menos 75 genótipos por hectare mantém mais estabilidade nos níveis de diversidade genética nas populações para a espécie. Sebbenn et al. (2001)

discorrendo sobre o número de genótipos necessários para reduzir os efeitos negativos do manejo (deriva genética) e aumento da endogamia, sugeriu a manutenção de 67 indivíduos por hectare. Os resultados aqui obtidos suportam esta hipótese. Ressalta-se que a manutenção de 75 indivíduos representa apenas 23% das árvores presentes em um hectare na região de Iguape (324) e a retirada de 77% dos genótipos. Contudo, estes 75 genótipos devem obrigatoriamente estar em plena fase reprodutiva e, preferencialmente, devem ser selecionadas pelo seu maior DAP e forma do fuste tendendo a retidão. Dessa forma, considerando que o caráter retidão de fuste tende a apresentar herdabilidade média ( $>0,3$  a  $0,5$ ), existe a possibilidade das sementes que darão origem às futuras gerações, de incorporarem esta característica, ou seja, darão origem a novas populações formadas por árvores com fuste mais reto do que os observados hoje naturalmente nas populações de *T. cassinoides*, com poucos prejuízos para os níveis de diversidade genética para a espécie. Ainda, as árvores matrizes (75) devem estar distribuídas de forma homogênea em toda a área do caxetal a ser explorado, a fim de otimizar os cruzamentos. Sugere-se que sejam marcadas as árvores matrizes antes do manejo e que após sejam retiradas as árvores mais próximas dessas matrizes, de forma que os indivíduos parentes das matrizes sejam excluídos e a estruturação genética espacial seja minimizada, sobrando ao final 75 genótipos igualmente distribuídos por toda o hectare considerado.

Finalmente, ressalta-se que o método utilizado no presente estudo é limitado para a caracterização perfeita dos efeitos do manejo nos níveis de diversidade genética, devido a não considerar aspectos silviculturais e da biologia reprodutiva da espécie e somente alguns aspectos genéticos e amostrais, embora estes sejam fundamentais, para o entendimento pleno do quadro. O ideal seria que fossem implantadas parcelas permanentes em caxetais intactos para a avaliação dos incrementos médios anuais (IMA) e incrementos correntes (ICA), para se conhecer detalhadamente como é o crescimento e produtividade por área da espécie. Outro aspecto que deve ser estudado é a taxa de recrutamento e mortalidade nas populações e a biologia de polinização, determinando-se a distância de fluxo de pólen e distância de dispersão das sementes. Também é de fundamental importância na avaliação dos efeitos do manejo conhecer como ocorre o

fluxo gênico entre populações. De posse dessas informações, associadas aos parâmetros genéticos obtidas no presente estudo e usando modelos que interrelacionam todos estes parâmetros, como os presentes no programa ECO-GENE (Degen et al., 1996), seria possível realizar-se predições realísticas sobre os efeitos do manejo nos níveis de diversidade genética, a longo prazo, e chegar-se mais próximo a um modelo de manejo sustentado para *T. cassinoides*. No entanto, os resultados até então obtidos neste e em outros trabalhos com a espécie, apontam direções adequadas para seu manejo racional.

Tabela 8. Estimativa média de índices de diversidade genética de 100 amostras de populações naturais de *T. cassinoides* de diferentes tamanhos. ( $n$ =tamanho amostral;  $\hat{A}$ =número médio de alelos por locos;  $\hat{H}_e$ =heterozigosidade esperada em EHW;  $\hat{H}_o$ =heterozigosidade observada;  $\hat{f}$ =índice de fixação)

Tamanho das populações ( $n$ )	$\hat{P}_{95\%}$	$\hat{A}$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$
20	0,962 (0,082)	2,36 (0,17)	0,467 (0,081)	0,412 (0,076)	0,120 (0,116)
30	0,986 (0,046)	2,48 (0,15)	0,489 (0,061)	0,417 (0,065)	0,139 (0,094)
50	0,993 (0,026)	2,56 (0,14)	0,491 (0,046)	0,420 (0,055)	0,145 (0,068)
75	0,997 (0,019)	2,67 (0,12)	0,502 (0,031)	0,424 (0,042)	0,157 (0,057)
100	1,00 (0,0)	2,73 (0,10)	0,509 (0,017)	0,432 (0,024)	0,151 (0,027)
267	1,00	2,89	0,511	0,418	0,181

ns= não significativo.

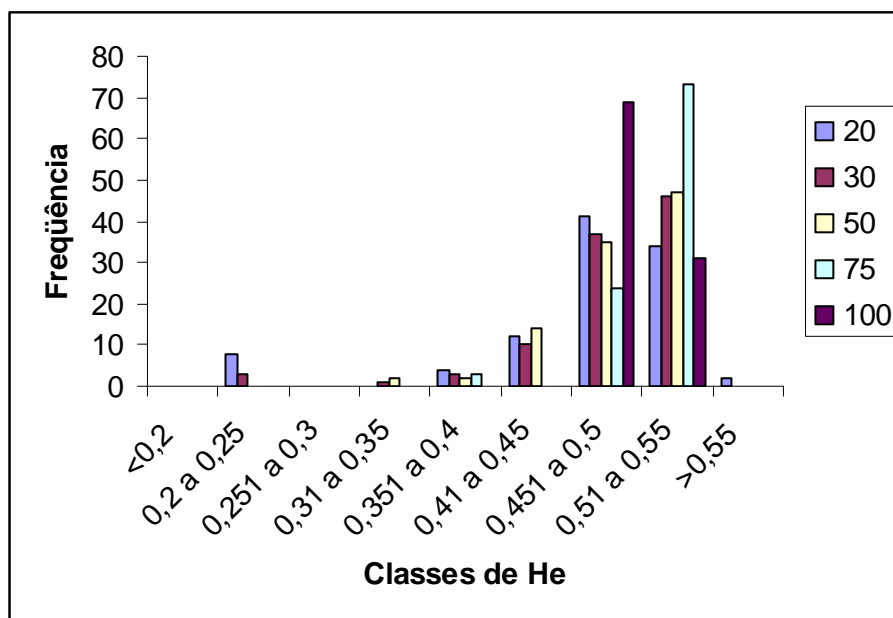
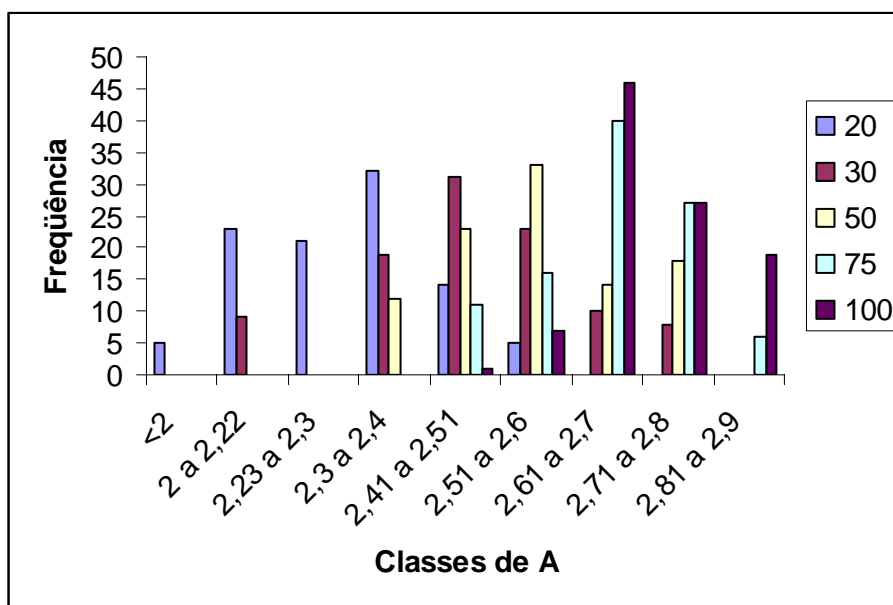


Figura 8 - Distribuição do número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e da heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\hat{H}_e$ ) em 100 amostras aleatórias de populações de tamanho 20, 30, 50, 75 e 100 indivíduos

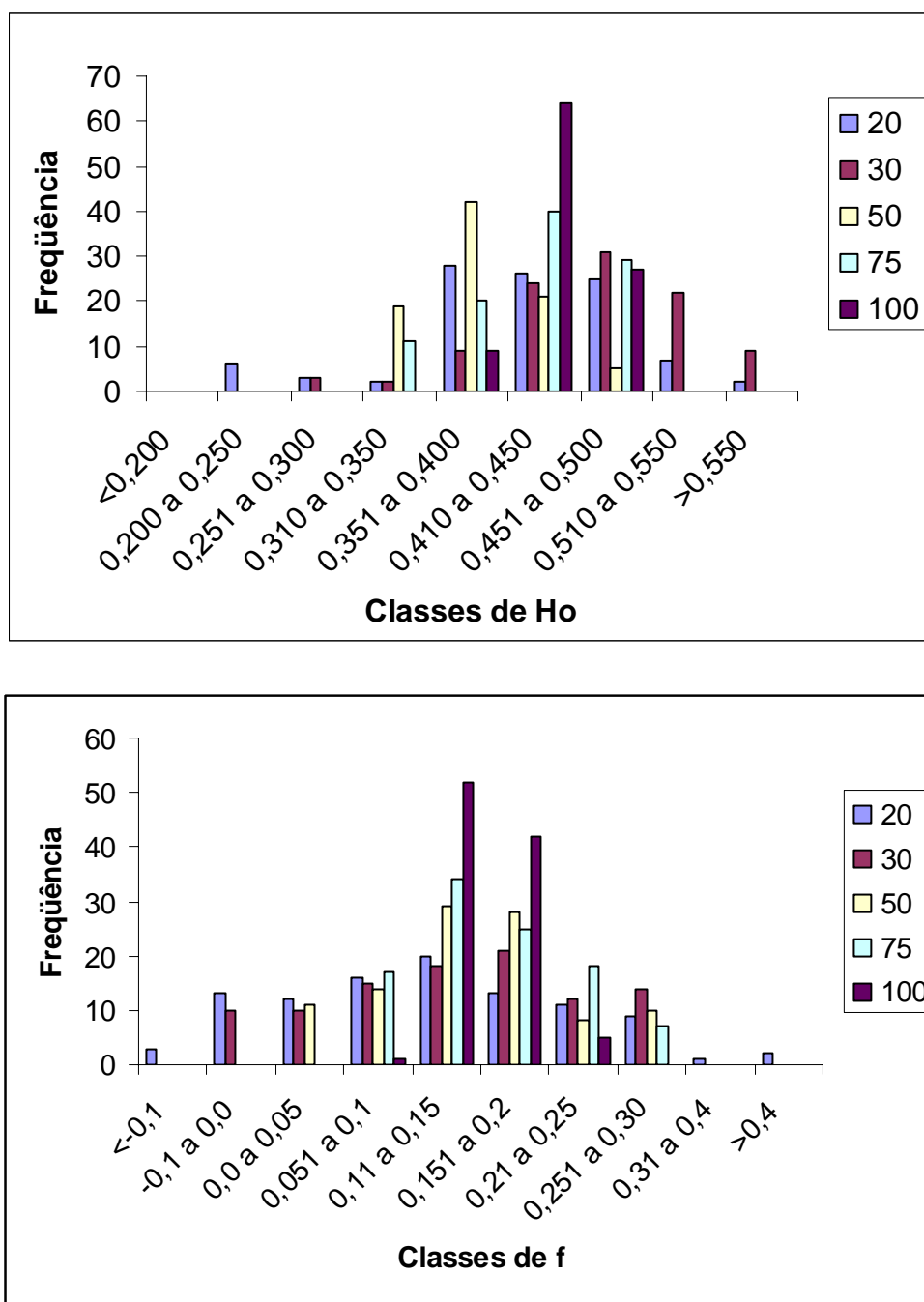


Figura 9 - Distribuição da heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ) e índice de fixação ( $\hat{f}$ ) em 100 amostras aleatórias de populações de tamanho 20, 30, 50, 75 e 100 indivíduos

## 5 CONCLUSÕES

1. *T. cassinoides* apresenta altos níveis de diversidade genética quando comparada a outras espécies arbóreas tropicais e coerente com a biologia da espécie.
2. A maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações naturais e manejadas.
3. As populações naturais apresentam maiores níveis de diversidade genética comparada as manejadas.
4. A distribuição espacial dos genótipos de *T. cassinoides* varia entre populações, sendo observado desde forte estruturação genética espacial até distribuição aleatória.
5. O manejo praticado na região afeta principalmente o número médio de alelos por locos e em menor escala os níveis de heterozigosidade.
6. De acordo com as simulações realizadas, para que o manejo cause baixo impacto nos níveis de diversidade genética nas populações de *T. cassinoides* é necessário a manutenção de pelo menos 75 indivíduos adultos e reprodutivos por hectare, sendo que estes devem ser distribuídos homogeneamente por todo o hectare.



## **ANEXOS**

Anexo A - Plano de manejo da *T. cassinoides*, para o Estado de São Paulo

**D.O.E., Seç. I, São Paulo, 102 (78), Sábado, 25 abr. 1992 - 23**

**Resolução SMA - 11, de 13-4-92**

***Estabelece normas para exploração da Caixeta (Tabebuia cassinoides) sob regime de rendimento auto sustentado no Estado de São Paulo***

O Secretário do Meio Ambiente, considerando a necessidade de ser regulamentada a exploração sustentada da Caixeta (*Tabebuia cassinoides*) no Estado de São Paulo e com fundamento no que dispõe o artigo 14 da Lei 4.771/65 (Código Florestal), combinado com o artigo 2º da Instrução Normativa 84/91 do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), resolve:

Art. 1º - A Exploração da Caixeta (*Tabebuia cassinoides*) está condicionada à autorização do Departamento Estadual de Proteção de Recursos Naturais, de acordo com o Plano de Manejo Florestal elaborado nos termos desta resolução.

Art. 2º - Constitui-se instrumento indispensável à exploração da caixeta o Plano de Manejo Florestal, a ser apresentado pelo interessado no ato da solicitação da autorização, aonde deve constar:

I) O inventário florestal da espécie contendo:

- a) frequência de árvores porta-sementes (no/ha)
- b) distribuição diamétrica das árvores
- c) volume anual a ser explorado
- d) volume de outras madeiras a serem cortadas para a construção da linha de vagonetes, bem como o local do corte.

II) Planta planialtimétrica da propriedade, contendo:

- a) Delimitação das áreas de preservação permanente, de Reserva Florestal Obrigatória e da área a ser manejada
- b) Localização das valas e/ou linhas de escoamento da madeira
- c) Talhões de exploração.

III) Cronograma da exploração e da condução da rebrota.

Parágrafo Único - No caso de imóveis com área inferior a 50 ha, é dispensável a apresentação de Plano de Manejo Florestal, e, nesses casos, o levantamento de dados poderá ser feito pelo próprio interessado, sob orientação, controle e fiscalização do órgão licenciador.

Art. 3º - São condições indispensáveis para a exploração da caixeta:

I) O corte somente de indivíduos com diâmetro à altura do peito (DAP) maior ou igual a 15 centímetros.

II) O corte de árvores de caixeta a uma altura de, no mínimo, 20 centímetros acima da linha d'água, no período de maior inundação do caixetal.

III) A manutenção de pelo menos 20 árvores de caixeta por hectare, adultas, sadias, e já em fase reprodutiva, a título de porta-sementes, distribuídas uniformemente pelo terreno.

IV) O compromisso do proprietário de providenciar a condução das rebrotas do caixetal, realizando-a entre 12 e 18 meses após o corte e mantendo até 3 brotos por touça.

V) A exploração anual de um volume máximo correspondente a 1/12 do total explorável, considerando-se o intervalo de corte de 12 anos para a espécie. Será aberta exceção às propriedades com caixetais muito pequenos, aonde seja inviável a extração por talhão.

Art. 4º - As valas ou linhas de transporte necessárias ao escoamento da madeira deverão ser locadas distando no mínimo 100 metros umas das outras, sendo permitida a locação de linhas convergindo a um mesmo acesso somente quando não houver outra alternativa de disposição, em condições a serem analisadas, pelas Equipes Técnicas do Departamento Estadual de Proteção de Recursos Naturais.

Art. 5º - O corte de outras espécies florestais existentes no caixetal só será autorizado para uso na construção da linha de vagonetes, sendo proibida sua comercialização.

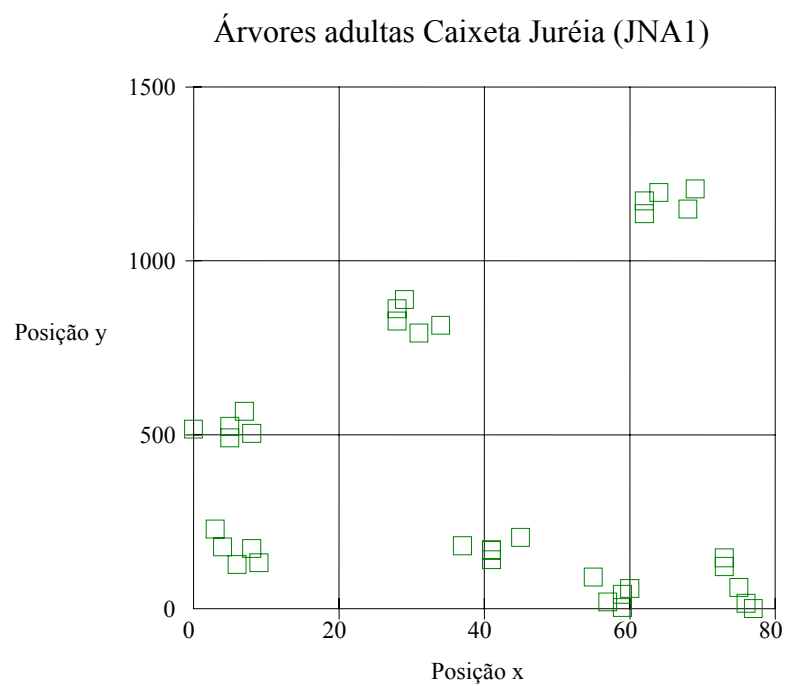
Art. 6º - Todo transporte e armazenamento de caixeta depende de licença concedida pelo Departamento Estadual de Proteção de Recursos Naturais - DEPRN.

Art. 7º - O cumprimento desta Resolução será fiscalizado pelo Departamento Estadual de Proteção de Recursos Naturais - DEPRN e pela Polícia Florestal e de Mananciais.

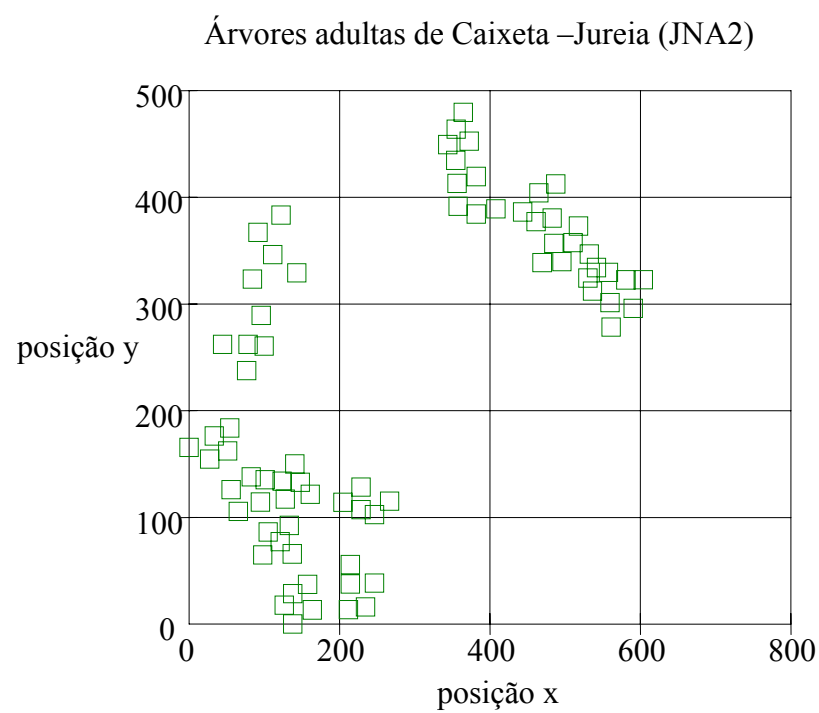
Art. 8º - O não cumprimento das disposições estabelecidas nesta Resolução sujeita o infrator às penalidades previstas em lei.

Art. 9º - Esta Resolução entrará em vigor a partir da data de sua publicação, revogada a Portaria DEPRN-10, de 1-12-89 e as demais disposições em contrário.

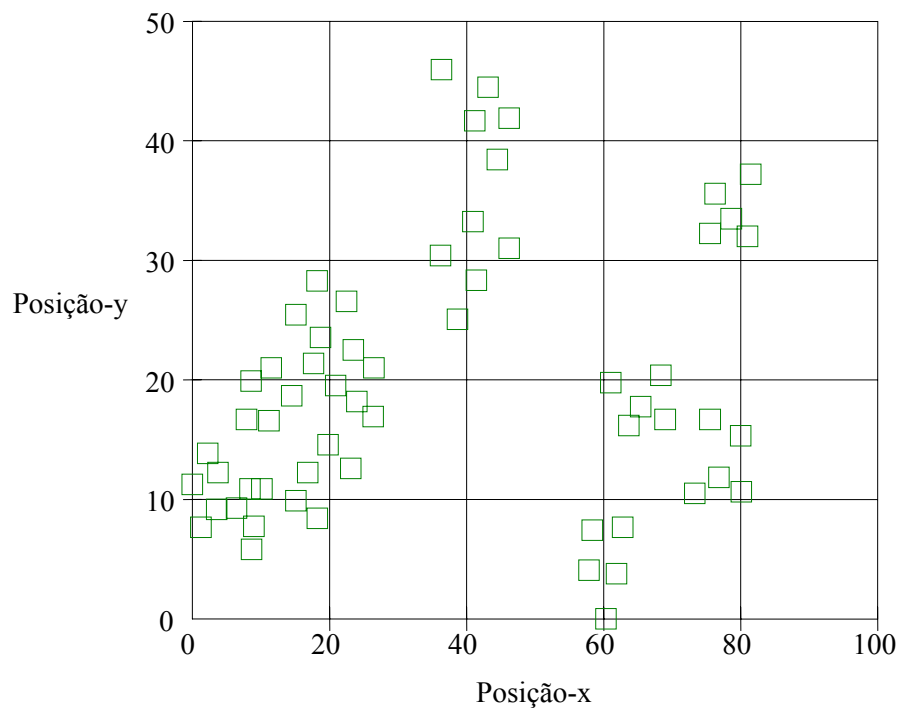
## Anexo B - Distribuição espacial dos genótipos amostrados na população Juréia (JNA1)



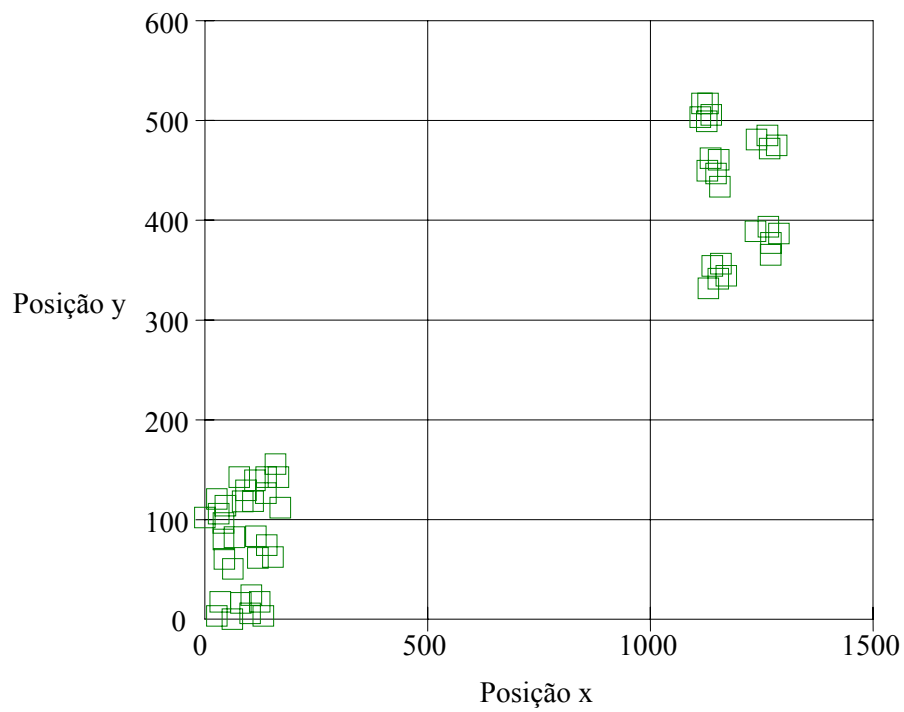
## Anexo C - Distribuição espacial dos genótipos amostrados na população Juréia (JNA2).



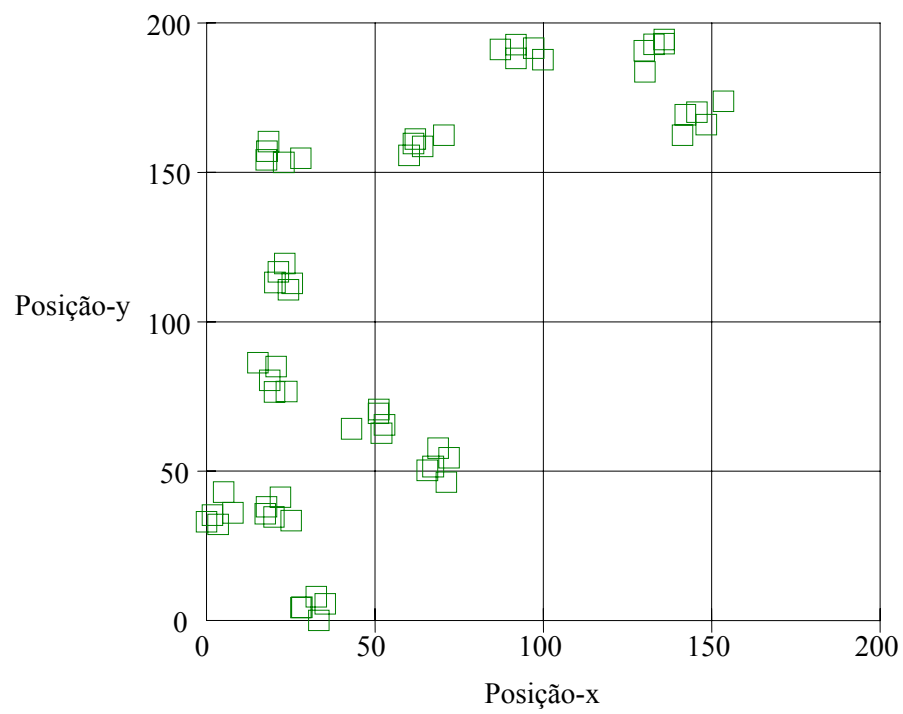
## Anexo D - Distribuição espacial dos genótipos amostrados na população Juréia (JNA3)



## Anexo E - distribuição espacial dos genótipos amostrados na população Retiro (RMA2)



Anexo F - Distribuição espacial dos genótipos amostrados na população Cindomel (CMA)



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 770 p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e fungos em essências florestais.** Viçosa: UFV, 1991.242p.
- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.
- ASHTON, P.S. An approach to the study of breeding systems, population structure and taxonomy of tropical trees. In: BURLEY, J.; STYLES, B.T. (Ed). **Tropical trees: variation, breeding and conservation.** London: Academic Press, 1976. p. 35-42.
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species for a lowland tropical community. **Evolution**, v. 28, p. 85-92, 1974.
- BAWA, K. S.; KRUGMAN, S. L. Reproductive biology and benetics of tropical trees in relation to conservation and manegement. In: GOMES-POMPA, A.; WHITMORE, T. C.; HADLEY, M. **Rain forest regeneration and management.** Paris: UNESCO,1990. cap 6, p.119-136.
- BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. 1. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, v. 72, n. 3, p. 331-345, 1985.
- BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. Quantification of diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 27, p. 415-424, 1997.
- BORGES, K.H. Regeneração natural, produção de sementes e o manejo da caixeta (*Tabebuia cassinoides* (Lam) D.C. São Carlos, 1997. 89 p. Dissertação(Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.



- BROWN, A.H.D. Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.52, p.145-157, 1978.
- BROWN, A.H.D. Genetic characterization of plant mating systems. In: A.H.D. BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1989. cap. 9, p. 145-162.
- BROWN, A.H.D. The role of isozyme studies in molecular systematics. **Australian Systematic of Botany**, v.3, p. 39-46, 1990.
- BROWN, A.H.D.; ALLARD, R.W. Estimation of mating systems in open-pollinated maize populations using isozymes polymorphisms. **Genetics**, v. 66, p 133-145, 1970.
- BROWN, A.H.D.; HARDNER, C.M. Sampling the gene pools of forest trees for ex situ conservation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Melbourne: CSIRO Publ., 2000. p. 185-196.
- BUDOWSKI, G. Distribution of tropical american rain forest species in the light of successional process. **Turrialba**, v.15, n.1. p. 40-42, 1965.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1994. 640 p.
- CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. Spatial structure of allozyme polymorphisms in a populations of *Eurya japonica* (Theaceae). **Silvae Genetica**, v. 49, n.1, p.1-4, 2000.
- CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v. 30, n.12, p.814-18, 1980.
- CLIFF, A.D.; ORD, J.K. **Spatial processes methods and applications**. London: Pion, 1981. 389 p.
- COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Covariances of relatives stemming a population undegoing mixed self and random mating. **Biometrics**, v. 40, p. 157-164, 1984.
- COLES, J.F. & FOWLER, D.P. Inbreeding in neighboring trees in two White Spruce populations. **Silvae Genetica**, v.25, n.1, p. 29-34, 1976.
- COOPER, W.S. The Fundamentals of vegetation change. **Ecology**, v.7, p.391-413, 1926.

- CROW, J. F.; AOKI, K. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 81, p. 6073-6077, 1984.
- CROW, J. F.; KIMURA, M. A. **An introduction to population genetics theory**. London: Row, 1970. 591 p.
- DEGEN, B. **Spatial genetic software (SGS) versão 1.0d**. <http://korov.cirad.fr/genetique> (23 ago.2003).
- DEGEN, B.; GREGORIUS, H.R.; SCHOLZ, F. ECO-GENE, a model for simulation studies on the spatial and temporal dynamics of genetic structure of tree populations. **Silvae Genetica**, v. 45, p. 323-329, 1996.
- DENSLOW, J.S. Gap portioning among tropical rain forest trees. **Biotropica**, v.12, p.47-55, 1980.
- DEWEY, S.E.; HEYWOOD, J.S. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. I. Distribution of genotypes. **Evolution**, v.42, p. 834-838, 1988.
- DIEGUES, A.C.; VIANA, V. M (Org.). **Alternativas de manejo sustentável de recursos naturais do Vale do Ribeira/SP - mata atlântica**. São Paulo: USP, NUPAUB, 2000. 273 p.
- ELLSTRAND, N.; ELAM. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p.217-241, 1993.
- EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L; WEIR, B.S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1990. p. 229-253.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman, 1997. 464 p.
- FEDEROFF, A.A. The structure of the tropical rain forest and speciation in the humid tropics. **Journal of Ecology**, v.96, p. 9-20, 1966.

- FERRETTI, A.R.; KAGEYAMA, P.Y.; ÁRBOCZ, G.F.; SANTOS, J.D.; BARROS, M.I.A.; LORZA, R.F.; OLIVEIRA, C. Classificação das Espécies Arbóreas em Grupos Ecológicos para Revegetação com Nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**. v. 3, n.7, p.73-77, mar./jun. 1995.
- FUCHS, E.J.; LOBO, J.A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation in flowering phenology in the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, v. 17, p. 149-157, 2002.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: SBG, 1992. 646 p.
- GANDARA, F.B. Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura especial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Campinas, 1996. 69 p. Dissertação (M.S) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- GEBUREK, T. Some results of inbreeding depression in serbian spruce (*Pecea omorica* (Panc.) Purk.). **Silvae Genetica**, v.35, n.4, p.169-172, 1986.
- GLAUBITZ, J. C.; MORAM, G. F. Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO, 2000. p. 39-59.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S.H.; MACBYDE B.; THOMAS N., L. **Genetics and Conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1983. p. 335-348.
- HAMRICK, J.L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P. (Ed.). **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations**. New York: Chapman and Hall, 1989. p. 87-105.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1990. p 43-63.
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isoenzima variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v.18, p. 201-207, 1986.

- HAMRICK, J.L.; MURAWISKI, D.A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon Neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, v.7, p.395-399, 1991.
- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.10, p.173-200, 1979.
- INSTITUTO AGRÔNOMICO DE CAMPINAS. **Macrozoneamento das terras da região do Rio Ribeira de Iguape, SP**. Campinas, 1990. 171 p. (IAC. Boletim Científico, 19).
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, 1992. 91p. (IBGE. Série Manuais Técnicos e Geociências,1)
- KAGEYAMA, P.Y. Conservação “in situ” de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, v.35, p. 7-37, 1988.
- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas. Implicações para o manejo e conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS, 3., São Paulo, 1994. **Anais da Academia de Ciências de São Paulo**, v.2, p.1-9, 1994.
- KAGEYAMA, P.Y.; LEPSCH-CUNHA, N.M. **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. Petrópolis: Ed. Vozes, 2001. 199-214 p.
- KNOWLES, P.G.R.; PERRY, D.J.; FOSTER, H.A. Spatial genetic structure in two Tamarack [*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch] populations with differing establishment histories. **Evolution**, v.46, n.2, p. 572-576, 1992.
- LACERDA, C.M.B. Diversidade genética por isoenzimas em populações naturais de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Freire, F.& M.F. Allemão) Anacardiaceae no semi-árido. Piracicaba, 1997. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LEDIG, F.T. Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants. In: SOULÉ, M. (Ed.). **Conservation biology**. Sunderland: Sinauer Associates, 1986. p.77-104.

- LEDIG, F.T. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. **Oikos**, v. 63, p. 87-108, 1992.
- LEPSCH-CUNHA, N. Variabilidade genética intrapopulacional de duas espécies de baixa densidade na Amazônia Central: *Couratari multiflora* (J.E. Smith) Eyma e *Couratari guianensis* Aublet. Piracicaba, 1996. 121p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **GDA - Genetic data analysis**: Version 1.0(d12) for Windows. Albuquerque: The University of New Mexico, 1999.
- LI, C.C. **Population genetics**. Chicago: University of Chicago Press, 1965. 366 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v.2.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, p.65-95, 1984.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Distribucion de la variacion en espécies de arboles tropicales. **Revista Biologia Tropicales**, v.35, n.1, p. 165-175, 1987.
- MALTEZ, H.M. Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.(APOCYNACEAE) Peroba rosa em uma floresta estacional semidecídua no Estado de São Paulo. Campinas, 1997. 132p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- MANTOVANI, W. Estrutura e dinâmica da floresta Atlântica na Juréia, Iguape. São Paulo, 1993. 126 p. Tese (Livre Docência) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- MARTINEZ-RAMOS, M. Claros, ciclos vitais de los arboles tropicales y regeneracion natural de las selvas altas perenifolias. In: GOMEZ-POMPA, A.; SIVA del AMO, eds. **Investigaciones sobre la regeneracion de selvas altas en Vera Cruz**, México: Editorial Alhambra Mexicana, S.A, 1985. t.2, p.191-240.
- MITTON, J.B. Conifers. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.). **Isozymes in plant breeding and genetics**, Amsterdam: Elsevier Science, 1983. p. 443-472.

- 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. ESALQ/USP, Piracicaba, 1993. 139 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MURAWSKI, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In: LOWMAN, M.D.; NADKARNI, N.M. (Ed.). **Forest canopies**. New York: Academic Press, 1995. p. 457-493.
- MURAWISKI, D.A.; HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individual on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v.67, p.167-174, 1991.
- MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forest. **Biotropica**, v. 26, p. 23-29, 1994.
- MURAWSKI, D.A.; GUNATILLEKE, I.A.U.N.; BAWA, K.S. The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. **Conservation Biology**, v.7, p.997-10002, 1994.
- MYERS, N. Threatened biotas: hotspots in tropical forests. **Environmentalist**, v. 8, p. 1-20, 1988.
- NEI, M; MARUYAMA, T.; CHAKARABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v. 29, p. 1-10, 1975.
- OBAYASHI, K.; TSUMARA, Y.; IHARA-UNINO, T.; NIIYAMA, K.; TANOUCI, H.; SYAMA, Y.; WASHITANI, I.; LEE, C.; LEE, S.L.; MUHAMMAD, N. Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selective logged forest of *Shorea curtissi* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis. **International Journal of Plant Science**, v. 163, n. 1, p. 151-158, 2002.
- PICKETT, S.T.A; KOLASA, J.; ARMESTO, J.J.; COLLINS, S.L. The ecological concept of disturbance and its expression at various hierarchical levels. **Oikos**, v. 54, p.129-136, 1989.

- RAJORA, O.P.; PLUHAR, S.A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 1203-1212, 2003.
- REIS, A.; FANTINI, A.C.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; DOEBELI, G. Aspectos sobre a conservação da biodiversidade e o manejo da floresta tropical atlântica. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, p.169-173. 1992.
- REIS, M.S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* M.). Piracicaba, 1996. 210 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v. 43, n.4, p. 848-859, 1989.
- RITLAND, K. Series of FORTRAN Computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, v. 81, p. 235-237, 1990.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v. 47, p.35-52, 1981.
- RITLAND, K. Multilocus mating system program MLTR. Version 1.1. University of Toronto, Canada. 1997.
- RYKIEL, E.J. Towards a definition of ecological disturbance. **Australian Journal of Ecology**, v. 10, p.361-365, 1985.
- SAKAY, A.K.; ODEN, N.L. Spatial pattern of sex expression in silver maple (*Acer saccharium* L.): Morista's index and spatial autocorrelation. **American Naturalist**, v. 122, p. 489-508, 1983.
- SÃO PAULO (Estado) Leis etc. Resolução SMA 11, de 13 de abril de 1992. Normas para a exploração da Caixeta (*Tabebuia cassinoides*) em regime de rendimento auto-sustentado no Estado de São Paulo. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, 25 abr. 1992. v.102, n.78. Seção 1, p.23.
- SCHOEN, D.J.; CLEGG, M.T. Estimation of mating system parameters when outcrossing events are correlated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 81, p.5258-5262, 1984.

- SEBBENN, A. M. Estrutura genética de suppopulações de *Genipa americana* L.(RUBIACEAE) a partir de isoenzimas. Piracicaba, 1997. 107 p. Dissertação (Mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SEBBENN, A. M. Amostragem para estimativa de freqüências alélicas e índices de diversidade genética em espécies florestais. **Revista do Instituto Florestal**, v.14, p.115-132 2001.
- SEBBENN, A.M.; SEOANA, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; LACERDA, C.M.B. Estrutura Genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: Implicações para o Manejo Florestal e a Conservação Genética. **Revista do Instituto Florestal**. v.13, p.99-113, 2001.
- SEBBENN, A.M.; SEAONE, C.E; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Efeitos do manejo florestal sobre a estrutura genética de Caixeta - *Tabebuia cassinoides*, no Vale do Ribeira, SP. **Scientia Forestalis**, v. 58, p.127-143, 2000.
- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology. I methodology. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 10, p. 199-228, 1978.
- SORENSEN, F.C. Frequence of seedlings from natural self-fertilization in costal Douglas-Fir. **Silvae Genetica**, v. 22, p. 20-24, 1973.
- SOUZA, L.M.F.I. de. Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* st Hil (BOMBACACEAE) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) – Brasil. Piracicaba, 1997. 76p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- STEBBINS, G.L. Introduction. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. (Ed.). **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. p.73-86.
- STRAUSS, S.H.; BOUSQUET, J.; HIPKINS, V.D.; HOUNG, Y.P. Biochemical and molecular genetic markers in biosystematic studies of forest trees. **New Forest**, v. 6, p.125-158, 1992.
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. BIOSYS-1. A FORTRAN computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. **Journal of Heredity**, v.72, p. 282-283, 1989.



- WATT, A.S. Pattern and process in the plant community. **Journal of Ecology**, v.35, p.1-22, 1947.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: North Caroline State University; Sinauer Associates, 1996. 445 p.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, n.2, p. 114-138, 1943.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p. 395-420, 1965.
- YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plant. **Tree**, v.11, n.10, p.234-243, 1996.