ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE Stylosanthes humilis
H.B.K. (LEGUMINOSAE) DE TRÊS REGIÕES ECOGEOGRÁFICAS
DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Gothardo Marcon

Naturalista

Orientador: Prof. Dr. Paulo Soderó Martins

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para ob-
tenção do título de Doutor em Agrono-
mia. Área de concentração: Genética
e Melhoramento de plantas.

Piracicaba

Estado de São Paulo - Brasil

março - 1988

M321e Marcon, Gothardo
Estrutura genética de populações de
Stylosanthes humilis H.B.K. (Leguminosae)
de três regiões ecogeográficas do Estado
de Pernambuco. Piracicaba, 1988.
179 p. ilustr.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Eletroforese aplicada. 2. Stilosante-
Genética aplicada. 3. Stilosante - População.
I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", Piracicaba.

CDD 633.39

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE Stylosanthes humilis
H.B.K. (LEGUMINOSAE) DE TRÊS REGIÕES ECOGEOGRÁFICAS
DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Gothardo Marcon

Aprovada em: 21.04.1988

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Paulo Sodero Martins	ESALQ/USP
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Profª Drª Margarida L.R. de Aguiar-Perecin	ESALQ/USP
Profª Drª Catalina Romero Lopes	UNESP/Botucatu
Prof. Dr. George John Sheperd	UNICAMP/Campinas

Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

- orientador -

Aos meus pais,
José ("in memoriam")
Maria e
irmãos,

OFEREÇO

A Vera,
Adriana,
Juliana e
Cristiano,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Paulo Soderro Martins, por sua orientação, apoio e amizade.
- Aos Professores Roland Vencovsky e Cassio R. de Melo Godoy pela ajuda concedida na análise estatística dos dados.
- Ao funcionário Ronaldo Rabello, pela colaboração prestada na condução dos trabalhos de laboratório e na coleta dos dados de campo em Anhembi, Piracicaba, SP.
- Aos colegas e amigos Professores Joselito Sobreira Medeiros, José Espinhara da Silva e Marta Geruza Larocerie do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela amizade e colaboração na solução de problemas surgidos pelo afastamento da unidade de trabalho.
- À Neuza Camêlo de Macêdo, Vânia B. Rabêlo, Auxiliadora Gonçalves e Moacyr Marcon, pelo apoio e amizade sempre presentes.
- Ao Professor Dr. João Lúcio de Azevedo, pela amizade e facilidades concedidas como Diretor do Departamento de Genética.
- A todos os colegas da pós-graduação, em especial aos amigos Wilson Aragão, Ima C.G. Vieira, Elizabeth A. Veasey, Jorge A.G. da Silva, Carlos Colombo, José C. Bassoi pela convivência, apoio e incentivo durante todo o período do curso.
- Aos colegas Francisco Rodrigues Freire Filho e Clodoaldo da Anunciação Filho, pela colaboração, amizade e convivência.

- À Professora Dra. Catalina Romero Lopes pela amizade e gentileza em facilitar e ceder material de laboratório indispensável para a execução deste trabalho.
- Às funcionárias Nilce T.P. Sigrist, pela colaboração na revisão das referências bibliográficas, e Gerda Spruk pela disponibilidade mostrada em sua função de secretária.
- À todos os professores e funcionários do Departamento de Genética pela colaboração e atenção dispensada.
- Ao CNPq e a UFRPE pelos auxílios financeiros concedidos.
- A todas as demais pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, o nosso sincero agradecimento.

SUMÁRIO

página

RESUMO	vii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A espécie <i>Stylosanthes humilis</i> H.B.K.	4
2.1.1. Caracterização morfológica	4
2.1.2. Distribuição geográfica e ecológica ..	5
2.1.3. Informações biológicas	7
2.1.4. Importância agrônômica	8
2.2. A técnica de eletroforese	9
2.2.1. Eletroforese na análise genética	9
2.2.2. Variabilidade genética em populações naturais de plantas	14
2.2.3. A diversidade isoenzimática e as condi- ções geográficas e ecológicas	18
2.3. Taxa de cruzamento e sua função em populações naturais de plantas	21
2.4. Resposta das características morfoisenzimáti- cas às condições ambientais	27
2.4.1. Características gerais	27
2.4.2. Respostas dadas à características ge- néticas específicas	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Material	34
3.2. Métodos	42
3.2.1. Coleta de sementes	42
3.2.2. Análise eletroforética	43
3.2.3. Análise dos resultados da análise iso- enzimática das populações naturais ...	51

	<u>página</u>
3.2.4. Estimativas de taxa de cruzamento com marcadores isoenzimáticos	54
3.2.5. Análise da relação morfo-isoenzimática e ambiental	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Variabilidade genética em populações naturais de <i>Stylosanthes humilis</i>	61
4.2. Divergência genética entre populações e regiões ecogeográficas	103
4.3. Determinação da taxa de cruzamento e seus efeitos sobre a estrutura populacional	115
4.3.1. Taxa de cruzamento em populações naturais presumindo equilíbrio endogâmico.	115
4.3.2. Taxa de cruzamento em populações naturais obtida através da segregação mendeliana quantificada nas progênies dos genótipos maternos	118
4.3.3. Taxa de cruzamento num ensaio de campo obtida através de progênies de genótipos homozigotos	122
4.4. Relação da variabilidade morfo-isoenzimática com a variabilidade ecogeográfica	128
4.5. Efeito do padrão aloenzimático sobre a produção forrageira em <i>S. humilis</i>	153
5. CONCLUSÕES	160
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE Stylosanthes humilis
H.B.K. (LEGUMINOSAE) DE TRÊS REGIÕES ECOGEOGRÁFICAS
DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Autor: GOTHARDO MARCON

Orientador: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

RESUMO

Neste trabalho, foram analisadas 25 populações de *S. humilis* H.B.K. cujas sementes foram coletadas em duas transeções (Norte-Sul e Leste-Oeste), ao longo de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco.

Todas as famílias coletadas foram analisadas em laboratório através da técnica de eletroforese. Foram determinados e estudados 20 locos isoenzimáticos sendo 15 polimórficos, pertencentes a cinco sistemas: catalase, esterase, leucina aminopeptidase, malato desidrogenase e peroxidase. Foram analisadas em média também 20 progênies por família para determinar a taxa de cruzamento em algumas populações naturais.

Com o objetivo de se avaliar a relação dos padrões de variabilidade aloenzimática obtida em laboratório e a influência da seleção natural nas diferentes condições ecogeográficas de origem de cada população, foram instalados dois ensaios no campo experimental de Anhembi, Piracicaba, sendo um para quantificar e analisar o desempenho dos caracteres morfológicos e agronômicos e outro para determinar a taxa de cruzamento usando locos marcadores (E_1 e E_2) homozigotos.

Progenies do ensaio instalado para obtenção da taxa de cruzamento e das plantas mais e menos produtivas do outro ensaio também foram analisadas por eletroforese para a obtenção dos resultados que são discutidos neste trabalho.

As conclusões básicas deste trabalho são as seguintes:

1. Em *S. humilis*, o polimorfismo isoenzimático é uma função da variação ambiental.
2. A diversidade gênica (H), que é a melhor expressão da variabilidade genética é uma evidência da resposta imediata às condições ambientais principalmente clima, solo e tamanho da população.
3. A região do Agreste, apesar de ser a menor região estudada e suas populações ocorrerem à beira de rodovias e serem relativamente próximas, além de ser a região mais variável e de clima instável, comporta populações de maior variabilidade em todos os níveis genéticos estudados.
4. As duas regiões ecogeográficas extremas, Mata e Sertão apresentam padrões de variabilidade genética uniformes porém distintos, com menores valores na região da Mata, as quais são interligadas pelo padrão do Agreste que além de ser intermediário possui populações com valores superiores as outras duas.
5. Com base na estrutura genética das populações da região da Mata, concluiu-se que estas apresentam uma distribuição marginal, cujo estreitamento da variabilidade deve ter sido ocasionado pelo "efeito do fundador", levando à deriva genética.

6. As populações do Agreste e Sertão devem pertencer ao centro de diversidade da espécie.
7. A curva de distribuição da frequência da taxa de cruzamento em ensaio de campo, acompanha a curva da frequência do florescimento.
8. Quanto maior a taxa de cruzamento maior é a variabilidade observada nas populações naturais e menor é a divergência genética.
9. Os resultados de três metodologias para medir a taxa de cruzamento foram equivalentes, com variações médias entre populações e regiões de 21% a 32%.
10. As regiões climáticas não influem significativamente sobre a produção forrageira e sim sobre os caracteres relacionados à superfície foliar e comprimento do pecíolo foliar e internódio.
11. A produção forrageira em *S. humilis* em ambientes heterogêneos é favorecida pela variabilidade genética.
12. As populações provenientes de regiões de precipitação tardia apresentam maior produção de biomassa.
13. A variabilidade genética expressa pela proporção de locos polimórficos e pela diversidade é inversamente proporcional a precipitação pluviométrica anual, o que faz esta espécie ser bem adaptada ao semi-árido.
14. A diversidade gênica expressa pela quantidade de informação genética diferente (alelos diferentes) e pela heterozigotidade é positivamente correlacionada com a produtividade forrageira do *S. humilis*.

GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS OF Stylosanthes humilis
H.B.K. (LEGUMINOSAE) FROM THREE ECOGEOGRAPHIC
REGIONS OF THE STATE OF PERNAMBUCO

Author: GOTHARDO MARCON

Adviser: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

SUMMARY

Twenty five populations of *S. humilis* H.B.K. collected along two transects (North-South, East-West) in three ecogeographic regions of the State of Pernambuco, Brazil, were analysed at the level of families, through the technique of gel eletrophoresis.

Twenty isoenzymatic loci of wich fifteen were polymorphic were estabilished and studied. They belong to five systems: catalase, esterase, leucine aminopeptidase, malate dehydrogenase and peroxidase. Twenty progenies per family were also analysed to determine the crossing rate in natural populations.

With the aim of evaluating the relationship between the alloenzimatic patterns established in laboratory and the influence of natural selection in the regions of origin of each population, two field trials were conducted at the Experimental Station of Anhembi, Piracicaba, in order to quantify and to analyse the performance of morphological and agronomic characters, and to determine the crossing rate using homozygous marker loci (E_1 and E_2).

Progenies from the trial conducted to obtain

the crossing rate and the plants more or less productive from the other trial, were also analysed through electrophoresis to obtain the results discussed in this thesis.

The basic conclusions are the following:

1. In *S. humilis* the isoenzymatic polymorphism is a function of the environmental variation.
2. The genetic diversity (H), which is the best expression of genetic variability, is evidence of the direct response to the environmental conditions specially climate, soil and populations size.
3. The populations from the Agreste region showed the largest variation at all levels studied, although this region was the smallest region studied and its populations occur along roadsides and are very close one to another. Besides this, this region is the most variable and unpredictable of all regions studied.
4. The two extreme ecogeographic regions, Mata and Sertão exhibit a pattern of genetic variability uniform but distinct, with the smallest values for the Mata region. The two regions are connected by the Agreste pattern, which is intermediate and shows populations with values greater than the other two regions.
5. Based on the genetic structure of the populations from the Mata region, it was concluded that these populations exhibit a marginal distribution, with a reduction in the variability due probably to founder effect which led to genetic drift.
6. The populations from the Agreste and Sertão regions probably belong to the center of diversity of the species.

7. The curve of frequency distribution of crossing rate in the field trials follows the curves of frequency of flowering.
8. The larger the crossing rate, the larger the variability observed in natural populations, and the smaller the genetic divergence.
9. The results from the three methodologies used to estimate the crossing rate were similar, ranging among populations and regions from 21% to 32%.
10. The climatic regions do not influence the forage production significantly, but influence leaf area and length of leaf and internode.
11. Forage production in *S. humilis* in heterogeneous environments is favoured by genetic variability.
12. The populations from regions of late rains exhibit large forage production.
13. The genetic variability expressed by the proportion of polymorphic loci and diversity is inversely proportional to the annual rain fall.
14. The genetic diversity expressed by the quantity of different genetic information (different alleles) and by heterozygosity is positively correlated with forage production in *S. humilis*.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da estrutura genética das populações naturais oferece evidências da atuação dos diversos fatores ambientais sobre a dinâmica dessas populações. Considerada como a totalidade das relações ecológicas e genéticas entre os indivíduos (JAIN, 1975), a estrutura populacional local pode variar drasticamente ao longo da distribuição geográfica das espécies (BROWN, 1978).

A evolução de populações ocorre por mudanças em sua constituição genética, isto é, através de alterações nas frequências dos genes e genótipos. Assim sendo, o polimorfismo genético em populações naturais, é o produto de várias forças evolutivas ao longo da história dessas populações. Das três abordagens usualmente utilizadas em estudos populacionais, isto é, energética, genética e demográfica (SOLBRIG, 1980), a abordagem genética é que será utilizada neste trabalho. A vantagem desta abordagem para os objetivos que são propostos, é possibilitar a integração da teoria ecológica e genética.

A variabilidade genética surge como resultado da atuação de várias forças como a mutação, a recombinação e o fluxo gênico. As frequências gênicas podem ser alteradas pela seleção natural e pela deriva genética. Enquanto a mu-

tação, a recombinação e a deriva genética são processos casuais e independentes com respeito à adaptação, a seleção natural é um processo adaptativo direcional de mudança evolutiva.

A variabilidade genética existente em populações naturais vem sendo investigada desde o princípio do século, entretanto, apenas nas últimas duas décadas, o estudo de populações naturais de plantas tem se desenvolvido substancialmente. O progresso da Biologia Evolutiva está estreitamente ligado ao avanço técnico da Genética Molecular. Isto é especialmente verdadeiro para a Genética de Populações, onde os estudos da variação genética vêm sendo feitos por métodos cada vez mais sensíveis na detecção da variabilidade e sua história evolutiva. A análise eletroforética da variação enzimática, propicia uma eficiente estimativa quantitativa da variação genética dentro de populações naturais e da extensão da divergência genética entre populações. Porém, contrariamente aos estudos feitos com espécies animais, o número de estudos eletroforéticos em espécies de plantas ainda é reduzido.

As proteínas quer sejam enzimáticas ou estruturais, são altamente informativas do ponto de vista genético dos organismos e de suas alterações evolutivas, por serem a expressão quase direta dos genes. A eletroforese como técnica que revela as proteínas, tem ampla aplicação na avaliação da estrutura genética em plantas, pois detecta com facilidade as diferenças genéticas a nível do DNA em amostras representativas de populações (BROWN, 1978).

O sistema reprodutivo possui, sem dúvida, grande importância na determinação da estrutura genética e na dinâmica evolutiva das populações. Portanto, em

estudos evolutivos há necessidade de informações sobre este sistema desenvolvendo metodologias adequadas, como a eletroforese, para determiná-lo.

A pesquisa com material nativo coletado nas condições ecogeográficas naturais em que ocorrem, é fundamental na obtenção de informações sobre os aspectos ecológicos e genéticos das estratégias adaptativas utilizadas por essa espécie nos diferentes ecossistemas.

Por outro lado, o conhecimento biológico da espécie *Stylosanthes humilis* H.B.K., comprovadamente uma das melhores espécies de leguminosas forrageiras, para regiões tropicais semi-áridas é essencial para trabalhos de coleta e preservação de germoplasma e para programas de melhoramento.

O presente trabalho utilizando 25 populações naturais de *S. humilis* coletadas em 3 regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco tem os seguintes objetivos:

- a. detectar o grau de variabilidade genética (isoenzimática), existente em populações naturais de *S. humilis*;
- b. avaliar a diversidade (distância) genética entre populações naturais de *S. humilis*;
- c. determinar a taxa de cruzamento em populações de *S. humilis* sob diferentes condições ambientais;
- d. estimar a relação existente entre caracteres morfo-isoenzimáticos e diferentes condições ambientais;
- e. estabelecer a relação entre o padrão de variabilidade genética e a variabilidade fenotípica da produção forrageira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie Stylosanthes humilis H.B.K.

2.1.1. Caracterização morfológica

Stylosanthes humilis H.B.K., é uma espécie do gênero *Stylosanthes*, subtribo *Stylosanthinae*, tribo *Aeschynomeneae*, subfamília *Papilionoideae* da família *Leguminosae* (RUDD, 1981). O gênero estabelecido por SWARTZ em 1788, com apenas duas espécies (MOHLENBROCK, 1957), compreende, hoje, cerca de 40 espécies.

A espécie *S. humilis* é considerada autógama (STACE, 1984), de ciclo de vida anual (WILLIAMS et alii, 1984) e diplóide, com $2n = 20$ cromossomos (STACE & CAMERON, 1984). Apresenta a seguinte descrição botânica:

Stylosanthes humilis - H.B.K. Nov. Gen. et sp. 6.506-1823, ex Char.

Stylosanthes sundaica Taub. in Verh. Bot. Brand 32.21, 1890, ex Char.

Stylosanthes humilis (H.B.K.) Hester, in Rev. Sudamer Bot. 7-209, 1943.

Segundo FERREIRA COSTA (1979), *S. humilis* é uma leguminosa de ramos usualmente ascendentes, raramente prostradas, as vezes sublenhosos na base, alcançando 50 cm de comprimento, cobertos com pelos curtos e brancos; folíolos lanceolados a elípticos, folíolos terminais com 15-20 mm de comprimento por 2,5 - 3,5mm de largura, os laterais um pouco menores; pecíolo com 2,5 - 5,0 mm de comprimento. Espigas curtas, com 12 - 15 mm de comprimento, multifloras. Flores amarelas, cálice com 4 - 5 mm de comprimento. Lomento com um artículo fértil com 6 - 8 mm de comprimento. Semente quase sempre preta com 2,0 - 2,5 mm de comprimento. Para NASCIMENTO Junior (1981) é uma planta rasteira, com hastes finas e subprostradas. As folhas são trifoliadas e o fruto um aquênio. O lomento é provido de um estilete residual na forma de gancho que facilita a disseminação da espécie.

No Nordeste brasileiro, *S. humilis* é conhecido pelo nome comum de alfafinha do Nordeste ou erva de ovelha e na Austrália é denominado de "Townsville stylo".

2.1.2. Distribuição geográfica e ecológica

Stylosanthes é um gênero que ocorre na América do Sul e Central, África, Sri Lanka e Sudeste da Índia (ROBINSON & MEGARRITY, 1974). Para MOHLENBROCK (1957) e MEHRA & MAGOON (1974), o gênero *Stylosanthes* é nativo nas savanas dos Estados Unidos da América do Norte, América Central, Antilhas, América do Sul até o norte da Argentina, Ilhas Galápagos, África tropical, Madagascar, Sul da Índia e Sri Lanka; nas Américas ocorre, principalmente no México, Guatemala, Panamá, Colômbia, Venezuela e Brasil. Muitas espécies foram introduzidas na Austrália e na Malásia.

No Brasil, a ocorrência de diferentes espécies do gênero se verifica desde o norte até o sul do país, com predominância no Nordeste e Brasil Central. Das 40 espécies conhecidas, 25 são nativas no Brasil, sendo que destas, 19 são nativas no Estado de Minas Gerais (FERREIRA & COSTA, 1979; LEITÃO Filho & LOVADINI, 1974).

S. humilis é endêmico na América Central e do Sul. Ocorre desde a parte central do México até a região Nordeste do Brasil, englobando, além desses dois países, a Guatemala, Panamá, Colômbia, Venezuela, Honduras, Cuba, tendo sido introduzido com sucesso na Austrália e Malásia. No Brasil, a ocorrência desta espécie restringe-se aos Estados do Ceará, Pará, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (MOHLENBROCK, 1957); Pará, Maranhão, Rondônia e Amapá (DUCKE, 1959); Piauí, Rio de Janeiro, Goiás, Paraíba, Ilha de Fernando de Noronha e Minas Gerais (FERREIRA & COSTA, 1979).

Não obstante, a flora de Pernambuco ser uma das menos estudadas do Brasil (DUCKE, 1953), *S. humilis* já foi registrada em Olinda, Tapera, Auricuri, Gravatá, Serra das Russas, Serra Talhada e Petrolina (FERREIRA & COSTA, 1979).

Segundo NASCIMENTO Junior (1981), *S. humilis* é adaptado especialmente às áreas de climas tropicais semi-áridos, embora ocorra em áreas do Brasil com precipitação de até 1500 mm anuais. O mesmo autor observa também que esta espécie desenvolve-se bem em solos de baixa fertilidade, é tolerante ao excesso de manganês e alumínio, tem capacidade de extrair fósforo de solos pobres deste elemento e é pouco exigente em micronutrientes. Apesar disto, responde bem a adubação.

2.1.3. Informações biológicas

S. humilis distingue-se facilmente das demais espécies do gênero pelas vagens apendiculadas que devem apresentar um importante papel na distribuição da espécie a longas distâncias, pela facilidade com que se prendem ao pelo dos animais através do apêndice (BOGDAN, 1977; BARRIGA, 1979).

S. humilis é uma espécie anual, exigindo dias curtos para a floração e suas sementes possuem dormência (BARRIGA, 1979). O comprimento do dia é o fator fundamental no controle do florescimento, independente do dia de germinação (CAMERON, 1967). Este autor pesquisou os fotoperíodos e as latitudes de adaptação do *S. humilis* no norte da Austrália, e descobriu que os ecotipos precoces requerem 13 horas/dia, os de meia estação requerem 12 horas/dia e os tardios, 11,5 horas/dia para o florescimento. Em latitudes baixas os ecotipos precoces florescem primeiro, os quais retardam sua floração em latitudes altas.

A adaptação do *S. humilis* a regiões semi-áridas parece ser devida a vários fatores genéticos desenvolvidos por esta espécie, como: crescimento rápido da raiz principal atingindo as camadas do solo mais úmidas, o que lhe dá vantagem competitiva para o suprimento de água; adaptação a nível das folhas, seja em sua forma, área e movimentos relacionados com o sol e turgescência capilar que regula a transpiração (HUMPHREYS, 1981). Em estudos de adaptação a regiões semi-áridas, o mesmo autor, também observou que durante a fase de estabelecimento da plântula, as raízes do *S. humilis* crescem rapidamente às custas do crescimento aéreo, atingindo 50-60 cm durante as primeiras sete semanas. Este mecanismo segundo o autor tem dois aspectos: é vantajoso para a sobrevivência em períodos de estresse hídrico, prevalecendo na competição com outras plantas na

capacidade de obtenção de água, mas ao mesmo tempo perde na competição com outras plantas devido a um crescimento aéreo muito mais lento em condições sem deficiência hídrica, tendo em vista que o sombreamento é o fator mais deletério quando em consórcio. Entretanto, uma vez estabelecida torna-se uma planta de crescimento rápido, com hábito que varia de ereto a prostrado, sendo que o hábito ereto apresenta maior vantagem na competição.

2.1.4. Importância agronômica

As plantas forrageiras da família das leguminosas contribuem de maneira marcante na melhoria da qualidade das pastagens devido a sua habilidade em fixar nitrogênio atmosférico em associação com a bactéria *Rhizobium*, o qual em *S. humilis* tem a grande vantagem de não ser específico. Entretanto, a maior importância agronômica desta espécie é seu potencial forrageiro em regiões tropicais e subtropicais.

ROBINSON & MEGARRITY (1974) consideram o gênero *Stylosanthes* como um dos mais estudados entre todos os grupos introduzidos na Austrália; e as espécies *S. humilis* e *S. guianensis*, como as forrageiras mais conhecidas nos trópicos e subtrópicos, sendo que na Austrália, já existem 6 cultivares registrados de ambas as espécies. *S. humilis* foi a primeira espécie comercial, cujo potencial forrageiro foi observado por William Davies ainda em 1933 (BURT & MILLER, 1975). Segundo estes mesmos autores, esta espécie foi introduzida na Austrália, acidentalmente, por volta de 1914.

S. humilis é amplamente usado em solos pouco férteis, arenosos, regiões secas tropicais e subtropicais

e responde bem ao superfosfato. Segundo NASCIMENTO Junior (1981), produz em torno de 5 toneladas de matéria seca/ha/ano, e na estação seca as plantas fenam-se naturalmente e produzem grande quantidade de semente, muito apreciadas pelo gado. Pode ser usado em pastejo em cultura pura ou consorciada. Entretanto, por ser sensível ao sombreamento, as gramíneas perenes altas são capazes de interferir em seu crescimento, sendo por isto preferível o pisoteio intenso para diminuir esta interferência (GILLARD & FISHER, 1978).

2.2. A técnica de eletroforese

2.2.1. Eletroforese na análise genética

Entre muitas técnicas existentes para a análise de proteínas, a da eletroforese de zona (SMITHIES, 1955), seguida de métodos histoquímicos de coloração, para localizar as regiões de atividade enzimática diretamente no meio suporte (HUNTER & MARKERT, 1957), é a mais apropriada ao estudo de variações individuais em populações.

O princípio geral da técnica, envolve a separação de proteínas pela passagem de uma corrente elétrica através de um meio suporte que contém uma solução ionizada, onde está aplicada uma mistura de proteínas. Estas são separadas pelas diferenças moleculares de carga elétrica, tamanho e forma, determinando assim diferenças na velocidade de migração num gel com porosidade homogênea.

As proteínas enzimáticas, como produto quase direto dos genes, representam elementos de primeira ordem no estudo das variações genéticas em populações.

Excetuando alterações pós-síntese, as proteínas são o resultado da transcrição do DNA em mRNA e da tradução deste, de sorte que a ordem dos aminoácidos é geneticamente determinada, bem como as modificações decorrentes da estrutura primária.

Diferentes formas moleculares de proteínas, exibindo a mesma especificidade enzimática num organismo, é o que MARKERT & MOLLER (1959), e o "Standing Committee on Enzymes of the International Union of Biochemistry" (WEBB, 1965), definiram respectivamente de isozima e isoenzima.

A mobilidade eletroforética das proteínas possibilita, segundo HUBBY & LEWONTIN (1966), obter informações genéticas mais precisas no que se refere à detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituições alélicas de um loco e a estimativa da proporção de locos que mostram variação na população. Apesar de seus limites, a eletroforese constitui excelente instrumento para estudos sobre variação gênica, diversidade genética entre populações e como marcadores genéticos independentes da interferência do homem e do ambiente.

Na maior parte dos trabalhos realizados com isoenzimas em plantas foram utilizados cultivares de espécies de interesse agrônômico. Entretanto, o interesse pelo estudo com populações naturais, vem crescendo haja visto aqui no Brasil os trabalhos de CAVALLI (1976) e MOLINA (1984).

FRANKEL (1977), considerou importante, ao analisar uma população, fazer a distinção entre as populações naturais e as domesticadas. As primeiras são estruturadas em condições geográficas e ecológicas distintas, enquanto que as cultivadas, segundo BROWN (1978), não tiveram

seus caracteres naturalmente selecionados. Tal diferenciação fornece à variabilidade eletroforética funções distintas.

SCANDALIOS (1975), afirma ter sido evidenciado que o polimorfismo, entre locos enzimáticos se apresenta não seletivamente neutro e sim decorrente da função fisiológica e metabólica. Um problema importante a ser solucionado, é a determinação da função específica das isoenzimas. Poucos sistemas enzimáticos hoje são completamente conhecidos pela sua função e localização dentro da estrutura celular. Uma das primeiras contribuições foi reconhecer que as isoenzimas podem existir em diferentes organelas celulares e em diferentes compartimentos metabólicos dentro de uma única célula; malato desidrogenase (Mdh), por exemplo, localiza-se nas mitocôndrias (MARKERT, 1975).

Sabe-se, hoje, que as variedades múltiplas de uma enzima são necessárias para catalizar a mesma reação, mas sob diferentes condições metabólicas, ou em diferentes lugares na mesma célula, ou em células diferentes, ou na mesma célula em sucessivos estágios na diferenciação (MARKERT, 1975). As isoenzimas propiciam um material rico para investigar a estrutura e função de enzimas e para analisar seu papel no metabolismo celular. Mas elas também facilitam o estudo na diferenciação celular e na Genética de Populações e Evolução, porque apresentam excelentes marcadores da função gênica. No campo da evolução as isoenzimas são extensamente usadas porque permitem obter parâmetros de pressões de seleção no processo evolutivo (MARKERT, 1975).

Segundo ROSALKI (1974), os recursos que se podem obter das diferentes formas de uma molécula enzimática, podem ter como causa suas propriedades físicas (tamanho e carga da molécula), suas propriedades químicas, suas propriedades catalíticas e suas propriedades imunológicas. Por-

tanto, isto representa uma riqueza de informação bem superior e com maior pureza genética do que informações morfológicas onde muitos fatores atuam e poucos podem ser identificados. A combinação da especificidade eletroforética e da reação corante, torna possível distinguir enzimas particulares entre centenas de outras que podem estar presentes no extrato de um tecido da planta.

As isoenzimas são chamadas aloenzimas (ou alozimas), se seus polipeptídeos são especificados por diferentes alelos de um mesmo loco. Aloenzima é a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de aminoácidos nos peptídeos que compõem a enzima, e elas podem ser distinguidas se estas alterações afetam sua migração eletroforética. Desde que a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo é colinear com a sequência dos nucleotídeos que formam o código estrutural de um gene, as aloenzimas resultam da mutação gênica. Assim sendo, uma análise indireta da estrutura proteica usando a eletroforese é, em princípio a análise de um gene. É precisamente esta simples relação entre as bandas no gel e a sequência dos nucleotídeos dos genes que faz das enzimas eletroforéticas um consistente método analítico de estudos genéticos de populações (GOTTLIEB, 1977).

GOTTLIEB (1977) também relaciona as principais vantagens e limites da eletroforese: a. colinearidade que assegura às comparações sistemáticas poderem ser produtos de genes homólogos (que tenham origem comum); b. precisão e possibilidade de serem diretamente quantificada em termos de números e tipos de enzimas; c. possibilidade das comparações poderem ser feitas com enzimas que são pouco influenciadas por fatores ambientais; d. ausência da influência do peso do caráter, pois todas as enzimas tem o mesmo valor em similaridade na avaliação da divergência genética. LEWONTIN (1974) cita mais algumas vantagens, entre elas se desta-

cam: e. o efeito de substituição alélica no genótipo não depender do ambiente; f. a substituição alélica num loco geralmente pode ser distinguida em relação as outras substituições; g. os locos que são estudados representam uma amostra casual de todos os genes estruturais independente de seu nível de variação. Entre as limitações GOTTLIEB (1977), cita as seguintes: a. o pequeno número de enzimas amostradas, representadas pelas enzimas solúveis envolvidas no metabolismo intermediário; b. a redundância do código genético, que faz com que, sem o uso de técnicas especiais, apenas 30% das substituições de nucleotídeos sejam detectadas (SHAW, 1970). As aloenzimas que possuem mobilidade idêntica, não possuem necessariamente a mesma sequência de aminoácidos. Entretanto, testes adicionais são possíveis para determinar quais aloenzimas com a mesma mobilidade possuem diferentes sequências de aminoácidos.

Mesmo com estas limitações na elucidação eletroforética, a relação entre o fenótipo e genótipo, permanece plenamente aceitável, porque suas limitações podem ser especificadas e a direção e margem de erro são geralmente conhecidas (GOTTLIEB, 1977).

A análise genética pode ser simplificada com os dados eletroforéticos porque as bandas de enzimas, com poucas exceções, mostram uma herança do tipo codominante e segregam como simples fatores mendelianos (SCANDALIOS, 1969, 1974). Isto possibilita utilizar testes de progênie para se determinar a ação gênica de um grande número de locos num curto espaço de tempo.

As isoenzimas, além de sua aplicação como elementos funcionais, têm aplicação como genes marcadores, geralmente com vantagens sobre os caracteres morfológicos, podendo ser amostrados em diferentes fases do desenvolvimento

da planta, diferentes tecidos e órgãos e fornecer um grande número de locos. Assim, por exemplo, BROWN & ALLARD (1970), desenvolveram uma metodologia que permite estimar a taxa de cruzamento a partir de famílias de meios-irmãos, cuja mãe tem genótipo conhecido, o que é o caso dos indivíduos das populações naturais.

2.2.2. Variabilidade genética em populações naturais de plantas

A variabilidade é a mais importante consequência da evolução da meiose, diploidia e sexo, e constitui um dos fatores-chaves da evolução dos eucariotos (PANDEY, 1969). A presença de variabilidade genética dentro da espécie é que possibilita esta se adaptar às mudanças ambientais.

Entre as principais unidades de medida da variabilidade, a proporção de locos polimórficos por população (P), é muito utilizada, sendo que loco polimórfico é o que possui o alelomorfo mais comum, com uma frequência igual ou menor que 0,99 na população. O grau de heterozigose (H) é outra medida de variabilidade gênica usada, mesmo para organismos de autofecundação, embora neste caso não se relacione com a frequência de locos em heterozigose, por indivíduo, mas estime o grau de variabilidade gênica entre os indivíduos, também chamado de diversidade gênica. O índice de polimorfismo ($\overline{P_I}$) utilizado por alguns autores para medir o grau de diversidade gênica em populações de espécies autógamas é equivalente ao grau de heterozigose ou diversidade gênica (H). E o número de alelos por loco (A) numa população, é a mais simples estimativa do potencial adaptativo nas alterações evolutivas das populações (GOTTLIEB, 1975).

HAMRICK *et alii* (1979), observaram que, entre as plantas, as gimnospermas são mais variáveis que as angiospermas. Nas primeiras encontraram 67,010% de locos polimórficos ($\bar{P}$) e um índice de polimorfismo ($\bar{PI}$) de 0,270, significativamente maior do que as dicotiledôneas com $\bar{P} = 0,313$ e $\bar{PI} = 0,113$ e as monocotiledôneas com $\bar{P} = 0,397$ e $\bar{PI} = 0,165$. Os mesmos autores mostraram que várias outras características, além de diferenças taxonômicas, contribuem para o nível de variação genética intrapopulacional de uma espécie. O que se observa é que espécies com um período longo de vida, ampla distribuição geográfica, de fecundação cruzada e participando de estágios posteriores de sucessão na ocupação de ambientes, mantêm níveis intrapopulacionais de variação genética mais elevados.

Com o advento da eletroforese, tornou-se bem evidente que a soma total da variação polimórfica observada em locos enzimáticos de populações naturais é alta. Considera-se que a variabilidade, por si só é adaptativa e ecologicamente de importância funcional (BROWN, 1978). Infelizmente, as estimativas precisas da variabilidade genética dentro de populações naturais de espécies predominantemente de autofecundação, são ainda muito limitadas. O sistema de cruzamento de cada espécie tem um efeito marcante na composição genética de suas populações. É ele que determina os padrões pelos quais os gametas são reunidos determinando a distribuição das frequências genotípicas.

A reprodução por autofecundação aumenta a probabilidade de fixação ou perda de alelos, gerando a expectativa de que espécies autógamas tenham maior número de indivíduos homozigotos e sejam mais uniformes que as alógamas. As consequências essenciais da autogamia, como já foi mostrado por WRIGHT (1951), são a redução da variabilidade genética dentro das famílias e um aumento da variabilidade

entre famílias.

Populações de reprodução por autogamia preferencial são compostas de indivíduos homozigotos para a maioria de seus locos. Assim sendo, plantas autógamas frequentemente mostram menor variação por população que as de fecundação cruzada. Mas, de uma maneira geral, as primeiras mostram ser mais diferenciadas geograficamente, mesmo em escala microgeográfica (ALLARD & KAHLER, 1971). Estudos que comparam espécies relacionadas, com diferentes sistemas de reprodução, mostram esta situação. Em *Phlox*, *Leavenworthia*, *Lycopersicon* e em outras espécies, por exemplo, tem sido mostrado altos níveis de variabilidade genética nas espécies autógamas e alógamas. Enquanto as primeiras possuem variabilidade intrapopulacional menor, esta variabilidade é distribuída entre as populações mais do que nas espécies relacionadas de fecundação cruzada (SOLBRIG, 1972; RICK & FOBES, 1975; RICK et alii, 1976; LEVIN, 1978).

HAMRICK et alii (1979) acharam uma associação positiva entre a frequência de fecundação cruzada e o nível de variação genética dentro de populações. Plantas com autofecundação predominante, exibem uma proporção de locos polimórficos ($\bar{P}$) de 0,179 e um grau de diversidade gênica ($\bar{H}$) de 0,058, enquanto que nas espécies de fecundação cruzada era bem superior com $\bar{P} = 0,511$ e $\bar{H} = 0,185$. BROWN (1979), confirmou estes dados, e estudando apenas locos polimórficos obteve $\bar{H} = 0,290$ para as espécies de fecundação cruzada e $\bar{H} = 0,130$ para as de autofecundação.

ARROYO (1975), comparou os níveis de variabilidade genética entre duas espécies do gênero *Limnanthes*, sendo que a *L. floccosa* é autógama e a *L. alba* é de fecundação cruzada. Constatou que as quatro populações estudadas

da espécie autógama apresentaram níveis de variabilidade tão altos quanto os encontrados em populações de *L. alba*, enquanto que em outras quatro populações, a variabilidade era bem inferior a obtida, em média, para as populações de *L. alba*. As quatro populações da espécie *L. floccosa* que apresentaram níveis de variabilidade gênica relativamente altos eram todas originárias de áreas centrais da distribuição da espécie. As outras quatro populações, que exibiram níveis relativamente baixos de variabilidade gênica, eram geograficamente marginais e populações isoladas.

Observa-se que a variabilidade é afetada pelo sistema de cruzamento, mecanismos de controle genético das enzimas, diferenças ecológicas, mecanismos de dispersão e história evolutiva (LEVIN, 1978). Assim, estudos com espécies de plantas tropicais sugeriram que os níveis da variação genética são excepcionalmente altos em populações naturais (HAMRICK et alii, 1979).

São muitos os organismos em que não foi encontrada uma relação clara entre o sistema de cruzamento e a quantidade da variabilidade genética. Assim, por exemplo, a aveia selvagem, *Avena barbata*, é autógama e apresenta maior taxa de fecundação cruzada, mas é geneticamente menos variável que a espécie próxima também autógama, *A. fatua*. Evidências mostraram a vantagem do heterozigoto como um fator que mantém o polimorfismo em certas populações de *A. fatua*, enquanto *A. barbata* vale-se menos da diversidade gênica e mais da plasticidade fenotípica na adaptação a ambientes heterogêneos (JAIN & MARSHALL, 1967; ALLARD et alii, 1975).

Certamente, o sistema de cruzamento não é o único fator que afeta a variabilidade genética das populações. O fato da variabilidade ser inerente às condições de vida dos seres vivos significa que ela deve estar em todas

as espécies independente do sistema reprodutivo. Assim IMAM & ALLARD (1965), MARSHALL & ALLARD (1970) e HAMRICK & ALLARD (1972), chegaram a conclusão de que as populações de autofecundação podem ser tão variáveis geneticamente como as populações de alógamas. Isto porque, grande parte da variabilidade genética é mantida nas populações como adaptação à heterogeneidade ambiental no tempo e no espaço (BURNS & JOHNSON, 1971). A heterogeneidade ambiental promove a variabilidade genética através dos mecanismos da seleção disruptiva (DOBZHANSKY, 1970).

JAIN & ALLARD (1960) explicam a manutenção da variabilidade em autógamas, devido a vantagem do heterozigoto, como sendo um mecanismo importante em seu potencial evolutivo.

2.2.3. A diversidade isoenzimática e as condições geográficas e ecológicas

A diferenciação genética entre populações de uma mesma espécie corresponde ao estágio inicial da divergência evolutiva. Esta diferenciação, normalmente, resulta da ação de diferentes ambientes a que cada população está sujeita. O grau de diferenciação entre populações, obtido pela análise de isoenzimas, é geralmente medido pelo índice de diferenciação genética (D) ou pelo índice de similaridade genética (I) de NEI (1972), os quais se complementam.

É necessário que se distinga a diversidade gênica, entre populações que equivale a distância genética entre populações ou espécies, com a diversidade de espécies a nível de comunidade, que depende do número de espécies (variedades), sua abundância relativa e a estratificação resultante da heterogeneidade espacial e formas de vida (MACAR-

THUR, 1965).

Num estudo de 16 populações da pteridófita *Lycopodium lucidulum*, LEVIN & CREPET (1973), encontraram uma similaridade muito grande de $\bar{I} = 0,969$. BABBEL & SELANDER (1974), também encontraram uma similaridade gênica de $\bar{I} = 0,961$, entre populações de quatro espécies de plantas herbáceas dos gêneros *Lupinus* e *Hymenopapus*.

Em plantas predominantemente de autofecundação como a *Avena barbata*, CLEGG & ALLARD (1972), determinaram o índice de similaridade entre populações de $\bar{I} = 0,714$, sendo que 16 populações eram da Califórnia (EUA) e 9 de regiões do Mediterrâneo. A identidade genética entre as populações da Califórnia era $\bar{I} = 0,715$, entre as populações do Mediterrâneo era $\bar{I} = 0,666$ e entre populações da Califórnia e do Mediterrâneo era $\bar{I} = 0,726$. Segundo os autores, populações geograficamente muito afastadas podem apresentar similaridade elevada se vivem em habitats similares, e extremamente diferentes se, se desenvolvem em habitats diversos. Assim, foi observado pelos autores na Califórnia, onde duas populações separadas geograficamente de apenas 300 km, possuíam um índice de similaridade geneticamente baixo de apenas $\bar{I} = 0,167$.

SINGH & RHOMBERG (1987), enfatizam a influência das condições ecológicas e especificamente do clima sobre a identidade genética em populações de *Drosophila melanogaster*. Segundo eles, a distância genética entre populações são geralmente mais baixas dentro do mesmo continente. Entretanto, as populações de clima temperado apresentavam menor distância genética entre si, independentemente da distância geográfica, do que dentro e entre populações de clima tropical e subtropical, que por sua vez possuíam uma diversi

dade maior do que as comparações entre os climas temperados e tropical. Este trabalho mostrou também que a maior parte dos locos tinha distribuição da variação do tipo clinal, o que é consistente com a hipótese de que sua variação genética é mantida pela seleção balanceadora.

A hipótese de seleção balanceadora se fundamenta na escola selecionista, que advoga ser a origem e a manutenção dos polimorfismos enzimáticos decorrentes da adaptação diferencial de vários fenótipos resultantes de diferenças na função enzimática de cada aloenzima em ambientes particulares. O polimorfismo, segundo esta teoria, seria mantido por diferentes tipos de seleção balanceadora, seleção dependente de frequência e diferenças na adaptação a diferentes nichos ecológicos dentro de uma mesma região (JOHNSON, 1975; SELANDER, 1976).

Vários autores propuseram diferentes medidas de distância genética entre populações como SANGHVI (1953), CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967), ROGERS (1972) e outros. Entretanto, muitas destas medidas são estabelecidas sob o ponto de vista estatístico, mas não são claras dentro da unidade biológica de onde são tiradas as medidas. Ao contrário destas medidas, a distância genética proposta por NEI (1971, 1972), tem o objetivo de estimar as diferenças do número de códons por loco entre populações. Estas medidas, baseiam-se fundamentalmente na identidade de genes dentro e entre populações. Assim, a distância genética de Nei representa o número acumulado de diferenças gênicas por loco. A distância genética depende da frequência alélica, e os alelos com baixa frequência contribuem com menor peso.

RICK et alii (1977) e BROWN (1978), consideram a variação revelada através da eletroforese como um poderoso dado para expressar a diversidade genética nas popu-

lações. Isto confirma a opinião de GOTTLIEB (1977), de que, quando são considerados simultaneamente um determinado número de enzimas, a informação que eles expressam representa mais precisão e objetividade do que a mais complexa forma morfológica.

GRANT & GRANT (1956), trabalhando com plantas da espécie *Gilia ochroleuca* e LEWIS & LEWIS (1955), com a espécie *Clarkia purpurea*, ambas de distribuição ampla na América do Norte, concluíram ser as populações periféricas de cada espécie, mais autógamas e as centrais com taxas de cruzamento mais elevadas que as periféricas. GRANT (1975), acredita que este tipo de distribuição deve ser comum em plantas.

Estudos morfológicos em muitos organismos sugerem que o grau de polimorfismo diminui do centro de distribuição de uma espécie para a periferia (MAYR, 1977). Num estudo com populações naturais de *Drosophila pseudoobscura*, PRAKAS et alii (1969), confirmaram que as populações centrais possuíam um polimorfismo consideravelmente maior do que as populações isoladas, e as populações marginais apresentavam um polimorfismo intermediário.

2.3. Taxa de cruzamento e sua função em populações naturais de plantas

Os métodos tradicionais de se estabelecer o sistema de reprodução de uma espécie tem se baseado na observação de cruzamentos, no comportamento dos polinizadores, de várias características da morfologia floral, ou no resultado de experimentos de cruzamentos controlados. Estes métodos, entretanto, não possibilitam a medida direta do sucesso

reprodutivo nas populações, e a informação geralmente é inadequada para a análise a nível de populações.

A partir da segunda década deste século, geneticistas de plantas começaram a usar genes marcadores para obter estimativas quantitativas do sistema reprodutivo. JONES (1916)¹, citado por SHAW et alii (1981), estabeleceu números iguais de plantas anãs (homozigotas recessivas) e normais (homozigotas dominantes) em filas alternadas. A progênie normal nas plantas anãs não foi a metade como se esperava. Para compensar os cruzamentos anã x anã, multiplicou a taxa de cruzamento (t) por "2" e com isto intuitivamente obteve $\hat{t} = h/p$, sendo h = frequência de heterozigotos ($2.pq$), usado ainda hoje.

De JONES para cá, mais técnicas para detectar a taxa de cruzamento foram desenvolvidas. FYFE & BAILEY (1951), usaram metodologia estatística para obter a taxa de cruzamento em populações naturais ou não, em que a frequência alélica não era conhecida. Mas foi usando dados de variação eletroforética de aloenzimas, como marcadores, onde se obteve até hoje as melhores estimativas de taxas de cruzamentos em populações naturais.

A determinação precisa da taxa de cruzamento em populações naturais, sempre teve limitações como, a distância desuniforme entre as plantas, principalmente em árvores de grande porte, barreiras naturais entre as plantas analisadas, dificuldades em obter um bom marcador fenotípico que fosse polimórfico e o inconveniente destes marcadores geralmente exibirem dominância. As informações das aloenzimas conseguem superar praticamente todos estes inconvenientes (RITLAND & JAIN, 1981). Estes mesmos autores enfatizam que, como são vários os fatores que influem na taxa de cruzamento tais como, presença de insetos, variação climática, altura da

¹ JONES, D.F. Natural cross-pollination in the tomato. Science, Lancaster, 43: 509-510, 1916.

planta e densidade, as estimativas são garantidas para um determinado ambiente, devendo ser repetidas se houver mudanças significativas do mesmo.

Mais algumas vantagens do uso de marcadores bioquímicos sobre os morfológicos são importantes: a. os homozigotos recessivos dos caracteres morfológicos podem ser deletérios e os efeitos epistáticos e pleiotrópicos limitam o número de marcadores. Por outro lado, a maior parte das aloenzimas apresentam ação codominante, não causam efeitos deletérios e não apresentam pleiotropia e raramente epistasia, podendo distinguir os genótipos homozigotos dos heterozigotos (TANKSLEY & RICK, 1980); b. o processo permite usar partes da planta sem destruí-la e; c. permite analisar a mesma planta em diferentes estágios do desenvolvimento.

Existem duas maneiras de se estimar o sistema de cruzamento em populações de plantas usando marcadores isoenzimáticos. Primeiramente, e de maneira mais eficiente, pelo uso da frequência genotípica da progênie de famílias de genótipos maternos, e em segundo lugar, pelo uso da heterozigosidade presente numa população em equilíbrio. Segundo BROWN (1975), o procedimento experimental usado é a coleta de sementes por planta na natureza, e através delas se obtém a frequência gênica da progênie e a taxa de cruzamento que ocorreu nas plantas em que foram coletadas as sementes, e através destas se estima a taxa de cruzamento da população.

O modelo de BROWN & ALLARD (1970) que fundamenta toda esta metodologia para estimar a taxa de cruzamento, assume que a seleção neste caráter (do marcador) está ausente, que a taxa de cruzamento é a mesma para todos os indivíduos da população e o pólen é distribuído aleatoriamente entre as plantas maternas. A violação destas pressuposições,

pode ser identificada comparando as estimativas de um loco único com as de mais de um loco (SHAW & ALLARD, 1982).

Muitas plantas formam verdadeiros conglomerados de colônias junto a planta mãe (LEVIN, 1981). Como resultado, muitos cruzamentos podem acontecer entre parentais, entretanto, muitos fatores podem suavizar estes blocos endogâmicos e propiciar uma abertura da estrutura populacional, tais como, predadores de sementes, dispersores de sementes, polinizadores, competição entre plantas e até mesmo sistemas de autoincompatibilidade.

A endogamia dentro de uma população pode ser determinada pelo coeficiente de endogamia (F) ou índice de fixação ($\hat{F}$) (WRIGHT, 1969). Em geral, o índice de fixação sob panmixia é zero e poderá aumentar pela endogamia e diminuir pela seleção favorecendo o heterozigoto. Valores positivos significantes de $\hat{F}$ podem ocorrer por dois motivos: endogamia devido a autofecundação ou diferenças nas frequências alélicas do conjunto de pólen de cada planta dentro de uma população (efeito de Wahlund) (LI, 1955).

O índice de fixação ($\hat{F}$) pode ser usado como base para estimar o total de autofecundação. E, quando uma população se encontra dentro dos limites de aproximação do equilíbrio endogâmico, podemos estimar a taxa de cruzamento ($\hat{t}$) com base no coeficiente de endogamia (F) (NEI & SYAKUDO, 1958). Entretanto, devido a vários fatores que geralmente afetam o equilíbrio e a taxa de cruzamento, esta, é calculada por esta metodologia, apenas para estudos preliminares, que não exigem precisão.

Por outro lado, a taxa de cruzamento obtida a partir da estrutura de famílias dentro da população possibi-

lita estimar a taxa de cruzamento ($\bar{f}$) e a frequência alélica (p') do conjunto de pólen, os quais são independentes da distribuição genotípica da amostra de plantas maternas coletadas. Com isto, elimina-se a restrição de que a população esteja em equilíbrio.

Os sistemas de reprodução são classificados em três classes com relação às taxas de cruzamento: alogamia exclusiva ou predominante, autogamia predominante e a intermediária. Cada uma destas classes possui uma característica própria que é o compromisso entre uma alta necessidade de adaptação imediata e a flexibilidade necessária para a futura sobrevivência. A baixa incidência de cruzamentos entre os genótipos de uma população, pode favorecer a vantagem do heterozigoto que prolonga o período sobre o qual a segregação pode ocorrer (JAIN & ALLARD, 1960). Os mesmos autores consideram a vantagem do heterozigoto como sendo equivalente ao aumento da taxa de cruzamento. Ou seja, a alta vantagem do heterozigoto que favorece as espécies predominantemente autógamas, é substituída pelo alto nível de cruzamento das alógamas.

Uma taxa de cruzamento intermediária, leva a uma segregação que, submetida a uma autopolinização predominante possibilita avaliar muitas novas combinações de genes, oferecendo assim uma ampla abertura adaptativa a novos ambientes.

A endogamia completa entre plantas silvestres é rara. Contrariamente, nas cultivadas é bastante comum. Nem por isto, as causas que parecem ter levado ao estabelecimento da autofertilização são só negativas. Existe também uma causa positiva para o estabelecimento da autofertilização que está associada a colonização de novos habitats (STEBBINS, 1950).

Isto possibilita a formação de novas populações com a instalação de apenas um ou dois colonizadores iniciais.

GOTTLIEB (1977) mostrou que a taxa de cruzamento geralmente não é estática, pois a maior parte das espécies apresenta uma taxa de cruzamento de valores contínuos, sendo que algumas vão desde alógamas obrigatórias passando por vários graus de cruzamentos para autofertilização, até a completa autogamia. ALLARD & JAIN (1962), já haviam afirmado que uma grande proporção de plantas é de fecundação mista, e entre estas espécies encontram-se as que são muito bem adaptadas e versáteis.

STACE (1982), aplicando a metodologia de MARSHALL & BROUÉ (1975), e a enzima álcool desidrogenase (Adh) como marcador, obteve a taxa de cruzamento ($\bar{t}$) de introduções em *Stylosanthes scabra*, na Austrália, constatando que $\bar{t}$ variava de 1,3% a 2,9%. Com *S. guianensis* (CAMERON & IRWIN, 1986), usando um marcador fenotípico e a seleção favorecendo a taxa de cruzamento, com o propósito de aumentar a resistência a antracnose (que é controlada por um gene dominante simples) através de cruzamentos naturais, obtiveram uma taxa de cruzamento que variava de 1,6% a 21,9%, com uma média geral de $7,0\% \pm 0,20\%$. Portanto, como qualquer outro caráter genético, é possível alterar a taxa de cruzamento por simples seleção. MILES (1985) utilizando o marcador morfológico cor da flor, determinou uma taxa de cruzamento de $0,138 \pm 0,001$ em *S. guianensis*.

2.4. Resposta das características morfoisoenzimáticas às condições ambientais

2.4.1. Características gerais

Adaptação é a propriedade de um genótipo que o permite sobreviver quando submetido a seleção; ao passo que adaptabilidade, é a propriedade de um genótipo ou população de genótipos que permite alterações subsequentes das normas de adaptação em resposta às pressões de seleção. Assim, adaptação e adaptabilidade são relacionadas, mas geralmente são fatores antagônicos que operam na seleção natural (MATHER, 1943). A adaptação apresenta dois aspectos básicos: adaptação específica a um ambiente e a adaptação geral, que é a capacidade de um genótipo produzir uma série de fenótipos adaptados a uma variedade de ambientes; é também chamada adaptabilidade genotípica ou flexibilidade fenotípica.

Existe muita discussão para saber se a variação aloenzimática em populações naturais é seletivamente funcional ou se é um mero entulho evolutivo (LEWONTIN, 1974). Tem se argumentado que se a estrutura genética de populações, determinada mediante informações da variação aloenzimática representa uma variação adaptativamente neutra, tal variação seria de pouco interesse prático, mormente para características agronômicas. Contrapondo, deve-se sobrepor que a vasta informação aloenzimática de amostras praticamente ao acaso da variação genética é uma informação a nível de DNA (RICK, 1976). A análise eletroforética fornece um considerável benefício a muitos tópicos, por ser uma das principais técnicas que pode levantar informações genéticas de um considerável número de genes. Por outro lado, indiretamente, os dados permitem um julgamento

de importância na seleção do conjunto da variação. É absolutamente indiscutível que um loco não pode ser estudado independentemente, se este faz parte de um conjunto de genes funcionais. Por outro lado, inferências e aplicações como marcadores de segmentos de cromossomo para cada loco, pode fornecer uma inestimável contribuição prática ao melhorista (BROWN, 1978).

NEVO & BAR (1976) sugerem que a variação aloenzimática é adaptativa e pode afetar a adaptação que é observada em plantas, como: a. seleção climática foi observada na adaptação diferencial de propriedades enzimáticas obtidas através da malato desidrogenase (Mdh) em *Typha latifolia*, envolvendo energia de ativação, termoestabilidade e níveis de atividade (McNAUGHTON, 1974); b. seleção climática também, principalmente devido a umidade, causou diferenciação genética em populações de aveia (CLEGG & ALLARD, 1972). Estes autores sugerem a existência potencial de correlação entre os fatores bioquímicos e/ou fisiológicos; c. JOHNSON (1974), SELANDER (1971), são unânimes em afirmar que a variabilidade das enzimas é relacionada com as diferenças ambientais, mas nenhum foi capaz de documentar a causa associada precisa com os fatores ecológicos particulares.

KOEHN (1969), trabalhando com peixes *Catostomus clarkii*, demonstrou que dois loci de esterase eram correlacionados com a temperatura. A frequência de um alelo mostrou uma distribuição clinal com maior frequência no norte e outro alelo maior frequência no sul. A atividade da enzima mais frequente nas populações do norte aumentava com a diminuição da temperatura, e a atividade da enzima mais frequente nas populações do sul aumentava com o aumento da temperatura.

POWELL (1971), trabalhando com *Drosophila* e LEVINTON (1973), trabalhando com ostras, chegaram a mesma conclusão de que o polimorfismo aloenzimático é uma função da variação ambiental.

MARSHALL & ALLARD (1970), mostraram haver alta correlação entre o padrão de variação morfológica e o polimorfismo eletroforético em espécies de aveia. Desde que os variantes morfológicos são estreitamente correlacionados com o padrão de variação ambiental, segundo os autores, e consequentemente são considerados adaptativos, a correlação entre eles e o padrão eletroforético, levaram os autores a sugerir que estas também são adaptativas. JAIN (1976) considerou que apesar das dificuldades que se tem na interpretação dos padrões geográficos os assuntos relacionados a variação ecológica e a ocorrência alélica, bem como a variação ecológica e o nível de diversidade são importantes questões a serem pesquisadas.

A utilização de caracteres quantitativos ligados a locos enzimáticos, abre novas perspectivas na utilização da informação aloenzimática na seleção e melhoramento de plantas cultivadas. Experimentos em milho, demonstram ligação de genes que afetam a produção com marcadores de enzimas (STUBER et alii, 1982). Híbridos interespecíficos de tomate foram usados como um modelo para monitorizar o mapeamento de locos de caracteres quantitativos com marcadores isoenzimáticos (TANKSLEY et alii, 1982). Este monitoramento pode ser específico para um caráter morfológico ligado, como também pode monitorizar através de uma série de informações isoenzimáticas o sequenciamento (mapeamento) dos caracteres nos cromossomos.

2.4.2. Respostas dadas a características genéticas específicas

Estudos quantitativos dos efeitos da seleção são difíceis, porque os dados não propiciam uma medida direta dos valores adaptativos de cada genótipo de um determinado loco. Além disso, inferências a respeito de valores adaptativos podem ser feitas pela comparação da frequência genotípica observada com a frequência esperada para um dado nível de autofertilização ou cruzamento.

Tentar particularizar os efeitos da seleção através de parâmetros de medida direta dos fatores genéticos é sem dúvida uma questão importante, porque eles não apenas possibilitam quantificar os fatores genéticos como também os efeitos do ambiente sobre estes fatores. Assim, por exemplo, podemos estimar a seleção gamética tomando uma amostra de plantas adultas as quais são analisadas através de suas sementes e determinar os parâmetros de seleção ocorrida durante uma geração.

MULCAHY (1975), usou o método direto para medir a seleção gamética através da análise mãe-progênie. O objetivo desta análise é detectar a mudança da frequência gênica que pode ocorrer entre a população materna e a progênie por causa da:

- a. seleção sexual, ou sucesso diferencial de genótipos e cruzamentos diferentes;
- b. seleção na fecundidade ou produção diferencial de zigotos através de diferentes cruzamentos;
- c. seleção gamética ou segregação distorcida de heterozigotos.

Através da análise da frequência gênica nas

plantas mães e em suas progênies, é possível avaliar estatisticamente a contribuição destes três componentes de seleção. As possíveis hipóteses na seleção gamética as quais podem ser precisadas são a seleção favorecendo: plantas heterozigotas, certos gametas masculinos, contra certos alelos específicos, contra genótipos específicos ou ainda favorecendo certas plantas adultas.

Se genótipos individuais são conhecidos, é necessário lembrar que os mesmos não devem ser considerados independentemente, sabendo que existem unidades integradas como foi dito por DOBZHANSKY (1970). FALCONER (1981), complementa mostrando que o efeito médio de um gene pode ser expresso em função de valores genotípicos e frequências gênicas. E, ainda, a diferença entre os efeitos médios dos alelos pode ser obtida pelo efeito médio de uma substituição gênica. E, o valor genético de um indivíduo é igual a soma dos efeitos médios dos genes que ele possui, sendo esta soma feita para o par de alelos de cada loco e para todos os locos.

Para FASOULAS (1974), o vigor que é uma forma de adaptação superior dos organismos é de dois tipos: um é manifestado por heteroalelos e outro por homoalelos. O primeiro conhecido como vantagem do heterozigoto é o vigor híbrido, e o segundo conhecido como vantagem do homozigoto, é o vigor da pureza gênica.

Para medir a adaptação, o maior problema ainda é determinar o valor adaptativo de um caráter, que altera sua frequência, sem saber as causas do aumento ou diminuição. Com efeito, nem todas as mudanças genéticas são o resultado das diferenças da viabilidade entre fenótipos ou genótipos, e sim poderá ser o resultado das diferenças na fertilidade ou

sucesso diferenciado na taxa de cruzamento ou competição gamética. Assim, a alteração da frequência gênica de um caráter pode ser devido a seleção gamética. Para uma medida rigorosa da ação da seleção natural é necessário estabelecer:

- a. a composição fenotípica e genotípica dos zigotos da população, antes de qualquer seleção;
- b. após a reprodução, quando a seleção se completou;
- c. obter a contribuição de cada fenótipo (e consequentemente o genótipo da geração descendente) (SOLBRIG, 1980).

CLEGG & ALLARD (1973), estimaram os componentes da viabilidade e fertilidade na seleção em uma população natural de *Avena barbata*, e os resultados indicaram uma significativa alteração das frequências genotípicas devido a viabilidade seletiva. Viabilidade seletiva é assumida como sendo a sobrevivência diferencial em função do genótipo do estágio de zigoto a adulto, ou de um estágio da geração "n" para o mesmo estágio da geração "n+1". O valor seletivo total, pode levar a uma subestimação, em que a fração do potencial reprodutivo da população que é absorvida na mortalidade diferencial, vem propiciar a manutenção da variabilidade genética.

A seleção favorecendo o heterozigoto em plantas, fenômeno também chamado de "paradoxo da heterozigosidade" por BROWN (1979), pode ser um importante fator para a manutenção de cruzamentos em plantas que possuem um certo nível de autofertilização. WEIR et alii (1972), observaram que o valor seletivo dos heterozigotos em 4 locos isoenzimáticos era de 52% superior aos homozigotos em sua capacidade reprodutiva. IMAM & ALLARD (1965), fizeram um experimento selecionando para alta e baixa produção de três caracteres quantitativos de plantas de aveia. Os resultados mostraram

claramente que as plantas de populações naturais de aveia são muitas vezes heterozigotas para genes que governam caracteres quantitativas e a maior parte da variabilidade observada entre famílias pode ser descrita como variabilidade segregacional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O material utilizado neste trabalho, é constituído de amostras populacionais de *S. humilis*, distribuídas em três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. São 25 populações distribuídas em duas transeções: uma Norte-Sul numa extensão de 150 km acompanhando o litoral, partindo da praia de Maria Farinha, Paulista, PE, no litoral norte, até Tamandaré, PE, no litoral sul; e outra Leste-Oeste numa extensão de 472 km para o interior do Estado de Pernambuco, partindo do Recife, PE, até São José do Belmonte, PE.

Na transeção Norte-Sul, as populações estudadas foram:

- A. População de praia do Janga, com 24 famílias, analisadas, distribuídas num trajeto de 500 m (Tabela 1), como amostras de pequenos agrupamentos de plantas formando colônias. A distribuição destas pequenas colônias se dá preferencialmente associada a gramíneas de porte baixo ou altamente submetidas ao pisoteio. Em relação a vegetação de praia da qual esta população faz parte, observa-se sua ocorrência a partir de 5 a 10 metros da primeira vegetação de beira de praia, de preferência sobre pequenas ondulações

mais secas do solo arenoso.

Estas observações se repetem para as demais populações de praia C e E.

- B. População de coqueiral da praia do Janga, formada por colônias, geralmente maiores do que as da praia, associadas com gramíneas rasteiras, pequenos arbustos e principalmente coqueiros (*Cocos nucifera*), distando 1000 metros da praia.
- C. População de praia de Pau Amarelo, com as características da população A, com a diferença de que esta ocupa uma extensão menor, é mais afastada da vegetação de linha de frente da praia, a uns 80 metros e, além da vegetação própria deste ambiente, está associada ao coqueiro.
- D. População de coqueiral de Tamandaré, com as características ambientais da população B; diferenciada por sua maior distância da praia, que é em torno de 2.500 metros.
- E. População de praia de Tamandaré, com as características ambientais das populações de praia A e C, estando também associada ao coqueiro e distando 500 metros da praia.

Esta região litorânea onde foram coletadas estas cinco populações, possui relevo tipicamente plano, de origem marinha ou fluvio-marinha. Nesta região como pode ser visto na Tabela 1, predominam os solos do tipo AB, de alta capacidade de infiltração e de transmissão de água, com areias profundas e agregados siltosos, ou simplesmente solos arenosos com as características AMD de solos arenoquartzosos profundos. Em decorrência da baixa latitude e altitude (Tabela 1), verifica-se uma pequena amplitude térmica anual, tornando a variação diurna o fator mais preponderante. Pra-

TABELA 1. Dados ecogeográficos de 25 populações de *Stylosanthes humilis* coletadas no Estado de Pernambuco, Recife, PE, 1985.

Popu- lação	Local de coleta	Região ¹	Amos- tra (N)	Distância de Recife (km)		Extensão da coleta	Precipi- tação média anual (mm)	Mês de maior preci- pita- ção	Altí- tude (m)	Tipo de solo ² (estru- tura)	Tipo de solo ³ (classi- ficação)	Classificação vegetal ⁴
				L-O	N-S							
A	Janga-I	M	24		15	500 m	1.651	maio	4	AB	AMd	5
B	Janga-II	M	19		16	600 m ²	1.651	maio	4	AB	AMd	4
C	Pau Amarelo	M	29		18	300 m	1.651	maio	4	AB	AMd	5
D	Tamandarê-I	M	36		130	400 m ²	1.191	junho	6	AB	AMd	4
E	Tamandarê-II	M	36		131	500 m	1.191	junho	4	AB	AMd	5
F	Serra das Russas	A	09	70		50 m	1.425	julho	350	CD	PE	2
G	Gravatã	A	12	83		400 m	468	ab/maio	447	D	PE	2
H	Bezerros	A	20	115		1500 m	598	ab/maio	471	AB	REe	2
I	Caruaru	A	31	130		1500 m	525	julho	545	D	PE	2
J	São Caetano	A	37	150		2000 m	477	abril	552	C	Pl	2
K	Cachoeirinha	A	35	160		300 m	445	ab/maio	780	CD	V	2
L	Belo Jardim-I	A	26	181		1000 m	800	abril	616	D	Re	2
M	Belo Jardim-II	A	22	188		1000 m	800	abril	616	D	Re	2
N	Sanharô	A	32	195		1000 m	780	maio	653	C	Pl	2
O	Pesqueira	A	06	240		80 m	676	abril	650	D	Re	2
P	Arcoverde	S	41	260		1000 m	590	março	663	A	REe	2
Q	Sertânia	S	38	283		1000 m	561	março	605	D	Re	2
R	Flôres	S	43	350		300 m	756	março	460	CD	NC	2
S	Serra Talhada-I	S	23	409		2000 m ²	624	março	435	CD	NC	1
T	Serra Talhada-II	S	24	410		1000 m ²	624	março	435	CD	NC	1
U	Serra Talhada-III	S	17	411		5000 m ²	624	março	435	CD	NC	1
V	Santa Rita-I	S	46	439		1000 m ²	624	março	435	CD	NC	1
X	Santa Rita-II	S	20	440		1000 m ²	624	março	435	CD	NC	1
Y	São José do Belmonte-I	S	35	460		2000 m	673	março	460	AB	PV	2
Z	São José do Belmonte-II	S	25	472		100 m	673	março	460	B	PV	3

¹ M = região da Mata; A = região do Agreste; S = região do Sertão.

² A = solos de alta capacidade de infiltração e transmissão de água - areias profundas agregados siltosos; B = solos de capacidade moderada de infiltração e transmissão de água - solos arenosos fracos; C = solos com capacidade baixa de infiltração e transmissão de água - solos argilosos fracos, arenosos fracos e rasos, com baixo teor de matéria orgânica e alto teor de argila; D = solos com capacidade muito baixa de infiltração e transmissão de água - solos salinos sódicos. (CONDEPE/SUDENE, 1987).

³ AMd = solos arenoquartzosos profundos; NC = solos formados pela associação de brunos não cálcicos + litólicos eutróficos; PE = solos formados pela associação de podzólicos vermelho amarelo e equivalente eutrófico + litólicos eutróficos + afloramento de rochas; Pl = planossol sódico eutrófico; PV = podzólico vermelho amarelo, orto fase floresta subperenifólia, relevo ondulado; Re = solos litólicos eutróficos; REe = solos formados pela associação de regossol eutrófico + planossol litólico eutrófico + afloramento de rocha; V = vertisol. (CONDEPE/SUDENE, 1987).

⁴ 1 = pastagem natural; 2 = margem de rodovias; 3 = margem de trilha na caatinga; 4 = coqueiros; 5 = vegetação de praia.

ticamente não existe uma caracterização sazonal por efeito da temperatura (IAA/PLANALSUCAR, 1987). As temperaturas médias anuais segundo a mesma fonte é de 25°C na região do Grande Recife. E, a vegetação natural que ocupa as estreitas planícies ribeirinhas situadas próximo ao litoral é a floresta ombrófila densa, que é uma vegetação constituída de árvores perenefoliadas com dominância das formas fanerófitas ombrófilas.

Entretanto, somente foi observado o *S. humilis* na Zona da Mata em locais muito alterados pela ação do homem. Em muitos outro locais, tanto interioranos como em praias pouco habitadas pelo homem, em condições menos alteradas, não foram encontrados vestígios desta espécie. Outro fator sempre presente nos locais destas populações é a presença histórica (longo período) de pescadores, muitos dos quais originários ou mantendo ligações com o "sertanejo" (habitante do sertão).

A Zona da Mata, ou aqui simplesmente denominada de Mata, é uma região de clima tropical chuvoso de monção, com verão seco, com menos de 60 mm de precipitação no mês mais seco, precipitação pluviométrica anual muito elevada (Tabela 1) devido às chuvas de monção. Compreende uma faixa no sentido Norte-Sul que se estrangula próximo ao Grande Recife (Figura 1).

Na transeção Leste-Oeste, mesmo passando pelas três regiões ecogeográficas (Região da Mata, do Agreste e do Sertão), observou-se a ocorrência de *S. humilis* apenas a partir dos limites da Mata com o Agreste com uma população F; nove populações do Agreste e dez populações do Sertão, que como se observa na Figura 1, abrange o Sertão de Moxotó (P), do Alto Moxotó (Q), Alto Pageú (R, S, T, U, V, X) e Sertão

FIGURA 1. Mapa de localização das 25 populações coletadas nas três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Recife, PE, 1985.

Central (Y e Z). Para facilitar o estudo dividiu-se as 25 populações em três grupos ecogeográficos mais semelhantes: 5 populações da Mata (A - E), 10 do Agreste (Região do Agreste) (F - O) e 10 do Sertão (Região do Sertão ou da Caatinga) (P - Z).

As populações do Agreste compreendem:

F. População da Serra das Russas, que se localiza na beira da rodovia, numa área pequena (Tabela 1), limitada pelas condições físicas de rochas e vegetação alta, no meio da encosta que separa a planície da Região da Mata com o Agreste a 447 m de altitude.

As demais populações do Agreste (G, H, I, J, K, L, M, N, O,), são todas distribuídas na beira da rodovia com extensões, tamanho das amostras, altitudes, precipitação e tipos de solos expressos na Tabela 1.

Os dados ambientais destas populações demonstram uma grande flutuação (Tabela 1), A topografia, altitude, períodos de precipitação, bem como a precipitação média anual e tipos de solos expressam uma variabilidade ambiental nitidamente destacada e diferenciada das outras duas regiões (Mata e Sertão).

A predominância de solos do tipo CD ou C e D nesta região, indica a presença de solos com capacidade baixa e muito baixa de infiltração e transmissão de água, solos argilosos e arenosos fracos e rasos, com baixo teor de matéria orgânica, com alto teor de argila, salínicos e sódicos.

Mostrando sua grande amplitude, os solos desta região vão desde ótimos do tipo A até D. A mesma diver-

sidade se observa na constituição edáfica, com solos tipo PE, REe, Pl, V, Re, enquanto nas duas outras regiões há quase uniformidade.

A Região do Sertão é limitada com o Agreste com a população P. As três populações P, Q e R se caracterizam pela sua abundância de plantas, distribuídas quase sem interrupções ao longo da rodovia, chegando mesmo a se enraizar e se desenvolver em rachaduras e margens do asfalto da rodovia.

As populações S, T, U de Serra Talhada, se caracterizam por serem de pastagens naturais. Cada uma destas três populações faz parte de um ensaio desenvolvido pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), sem implantar nada e nem alterar o consórcio de plantas forrageiras naturais. A única alteração vegetal é o corte das plantas arbustivas perenes que não apresentam utilidade forrageira. Este simples manejo propiciou uma nítida vantagem competitiva do *S. humilis* sobre as gramíneas.

As populações V, X da Vila Santa Rita, são as mais afastadas e isoladas em relação a rodovia. A estrada que leva ao local distante uns 30 km da pista torna difícil a passagem de qualquer carro motorizado. Estas duas populações também fazem parte de pastagens naturais cercadas e com intenso pisoteio pelo animal. Apesar de uma vegetação nitidamente de formação de caatinga e as condições naturais sem alteração recente, a abundância e a extensão da distribuição contínua destas populações é marcante.

A população Y fica às margens da rodovia, próxima da cidade de São José do Belmonte e em local de intenso pastoreio de rebanhos de ovinos. A população Z é ca-

racterizada por seu ambiente de estrada tipo trilha onde apenas é usada pelo animal e homem não motorizado, e a vegetação é tipicamente de caatinga.

A região do Sertão, não é tão uniforme como a primeira vista parece ser. Basta ver os diversos sertões com características locais expressos na Figura 1. Além disso, o tipo de solos e a precipitação (Tabela 1) também expressam variação, apesar de muito inferior ao Agreste. O período de precipitação é altamente uniforme, bem como a oscilação diurna da temperatura. O solo com algumas exceções é do tipo CD quanto a capacidade de infiltração e transmissão de água, e NC (CONDEPE/SUDENE, 1987).

As chuvas têm uma função preponderante para caracterizar estas três regiões. Enquanto no Sertão o pico da temporada das chuvas é março, no Agreste é abril e na Mata é junho. Além do período há diferenças nítidas também na quantidade (precipitação média anual) (Tabela 1), e na duração do período chuvoso, que, no Agreste geralmente é intercalado com veranicos.

Um fator de variação entre as populações do Sertão é a ampla diversidade de ambientes onde se localizam estas populações, o que não se observou nas outras duas regiões. Do Sertão são analisadas populações de beira de rodovias, de pastagens naturais, de pastagens naturais isoladas e distantes de rodovias, e as distribuídas ao longo de trilhas na caatinga.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta de sementes

Tendo em vista o tipo de análise envolvendo a determinação de locos enzimáticos, taxa de cruzamento, avaliação de linhagens (famílias) e suas progênies; a coleta de sementes foi efetuada em plantas individuais. A coleta consistiu de um número variável de sementes (10 a 200) por planta.

O número de famílias por população oscilou (Tabela 1) de conformidade com o tamanho e distribuição de cada população. Para que a amostragem fosse representativa da população, teve-se a precaução de coletar famílias distribuídas ao acaso ao longo de toda extensão da área local (população) com características físicas e ecológicas semelhantes, e evitando a coleta em plantas muito próximas. Por ter sido feita a coleta no mesmo período (14 a 22 de julho de 1985) e por haver variação no período de florescimento causada pelo período de precipitação diferente entre as três regiões, teve-se dificuldades em obter semente madura, principalmente nas populações da Região da Mata e algumas do Agreste.

Durante a coleta de sementes, foi feito levantamento dos tipos de inflorescência que ocorriam nas diversas populações.

3.2.2. Análise eletroforética

a. Sistemas enzimáticos utilizados

A escolha dos sistemas enzimáticos para a análise genética do material em laboratório, foi precedida por uma série de testes. Estes testes tinham o objetivo de fornecer as informações que possibilitassem escolher os sistemas enzimáticos e tecidos em diferentes estágios do desenvolvimento da plântula, que dessem boa resolução com máximo de informação.

Quanto aos tecidos, foi dada preferência aos de semente embebida e plântula por economia de tempo, espaço e trabalho e por serem estágios de maior atividade enzimática da planta, considerando as enzimas normalmente estudadas. Quanto aos sistemas enzimáticos, foram testados: álcool desidrogenase (Adh), fosfatase ácida (Acp), glutamato oxaloacetato transaminase (Got) e superóxido dismutase (Sod); com vários tecidos de *S. humilis* como, semente recém embebida, raízes, cotilédones, caules e folhas primárias de plântulas com idades diferentes (1 a 20 dias). Entretanto, nenhum destes sistemas foi aproveitado na análise, porque, apesar de todos terem apresentado pelo menos alguma atividade, nenhum deles teve uma resolução, e nitidez que permitissem uma análise segura a nível populacional. Com base nestes testes iniciais, os sistemas enzimáticos nos quais se obteve bons resultados e foram utilizados na análise foram: catalase (Cat), esterase (Est), malato desidrogenase (Mdh), leucina aminopeptidase (Lap) e peroxidase (Per).

b. Preparo dos géis

A análise dos cinco sistemas enzimáticos foi

feita por eletroforese em gel de amido, migração horizontal.

O gel de amido utilizado neste trabalho apresentou uma espessura de 2 mm, e a concentração de 12%. Os tampões utilizados foram os tampões A e B de SCANDALIOS (1969), na proporção de 1A:9B e pH 8,3. O amido era de dois tipos: 1/3 de amido importado da marca Sigma, e 2/3 de amido nacional, da "Refinações de Milho Brasil", Penetrose 30.

O gel era feito com 125 ml de tampão, 5 g de amido da Sigma e 10 g de Penetrose 30. Colocava-se o amido e o tampão num kitasato e mantinha-se sobre o fogo com movimentos rotativos contínuos até ser observado na solução um leve aumento de densidade; a partir deste ponto, o fogo era diminuído, as bolhas superficiais eram retiradas, e evitando a formação de outras bolhas, a solução lentamente alterava sua coloração leitosa para uma formação pastosa levemente translúcida e citrina. Neste estágio era colocado em canaletas de vidro com 17,0 cm x 15,0 cm x 0,2 cm, sendo então coberto com uma placa de vidro. Deixava-se esfriar à temperatura ambiente, sendo posteriormente resfriado a 4°C, pronto para receber os extratos das amostras homogeneizadas.

c. Preparo e aplicação das amostras

As sementes trazidas do campo, passaram pelo processo de debulha e limpeza e foram armazenadas por família em saquinhos de papel identificados.

Para preparar o material para a análise, a semente era escarificada, para facilitar a embebição, quebrando assim a dormência. Em seguida as sementes eram colocadas a germinar em caixas de plástico tipo "gerbox", previamente desinfetadas com álcool. Cada semente ou grupo de sementes

pertencentes a mesma família era colocada a germinar dentro de pequenos quadrados traçados a lápis sobre o papel filtro que além de poder identificar, era substrato e conservava a água durante a germinação.

Mesmo escarificadas e com as mesmas condições de temperatura de 25°C no germinador, geralmente não havia uma germinação e desenvolvimento uniformes de todas as sementes. Por isto, o estágio de desenvolvimento escolhido para ser feita a análise em cada sistema enzimático foi um marcador fisiológico.

De conformidade com os testes preliminares, as sementes com 12 horas de embebição (rompimento da cutícula e a emissão da raiz) foi o material analisado para as esterases, cotilédones de plântulas de 2 cm para as catalases, leucina aminopeptídasas, malato desidrogenases e peroxidases, sendo que as peroxidases também foram analisadas em ponta de raiz (1 cm).

Os homogenados de cada um desses materiais foram obtidos pela maceração dos mesmos com o auxílio de um bastão de vidro de extremidade esmerilhada, sobre placas de acrílico com escavações arredondadas, onde se colocava a amostra. Cada amostra ao ser macerada recebia 0,010 ml de tampão do gel. Para não diminuir a atividade enzimática, tanto as plântulas como o homogenado eram usados sem passar por armazenamentos e todas as etapas do processo desde a homogeneização até a revelação das enzimas era feito em ambiente ou anteparo de contato frio (4°C a 8°C).

Os homogenados eram absorvidos em papel filtro com dimensões 2 mm x 1,5 mm.

Para realizar a aplicação das amostras no gel, bastava retirar a placa de vidro que cobria o gel, cortá-lo com um pente (15, 18, 20 ou 26 dentes) e inserir nos orifícios os papéis com as amostras.

Para as peroxidases e catalases, que mostraram bandas catódicas, as amostras foram aplicadas a 5 cm da ponte do polo (-), enquanto nas esterases, malato desidrogenases e leucina aminopeptidases, foram aplicadas a 1,5 cm da ponte do polo (-).

Na maioria dos géis foi colocada uma ou mais amostras controles, que eram formadas por sementes de famílias altamente homozigotas as quais pertenciam a populações também altamente homozigotas (populações D e E). Numa ou nas duas extremidades das aplicações colocava-se um papel com solução de azul bromofenol para marcar a linha de frente durante a migração, que permitia saber quando interromper a corrida eletroforética.

d. Corrida, revelação e fixação dos géis

Os géis com as amostras aplicadas eram colocadas para a migração (corrida eletroforética) em cubas horizontais próprias, mantidas em geladeira com temperatura de 4°C. O tampão das cubas com os eletródios foi o tampão A de SCANDALIOS (1969), com pH 8,3. Foi mantida uma distância uniforme de 12,0 cm entre as pontes catódica e anódica, sendo a corrida eletroforética feita com uma diferença de potencial de 10 v/cm e 1 mA/cm em corrente contínua. A migração era interrompida quando a linha de frente atingisse 7,0 cm do ponto de aplicação para as catalases e peroxidases e 9,0 cm para as esterases, leucina aminopeptidases e malato desidrogenases.

Após a corrida eletroforética era feita a revelação (coloração) do gel para possibilitar a análise através dos zimogramas. A revelação das catalases (Cat) foi feita pela técnica de SCANDALIOS (1965) modificada:

- 1º) imersão do gel em solução de H_2O_2 (0,5%) - 50 ml (1 minuto);
- 2º) lavar o gel em água destilada - (1 minuto);
- 3º) imersão do gel em solução de iodeto de potássio (1%), acidificado com ácido acético glacial (0,5 ml) - 50 ml.

O gel era mantido nesta solução de revelação aproximadamente 15 minutos em condições de luz e temperatura ambiente.

No sistema das esterases (Est) a revelação foi feita pela técnica de SCANDALIOS (1969) modificada:

H_2O	20 ml
Tampão C	25 ml
Tampão D	5 ml
Fast blue RR (sal)	40 mg
α -naftil acetato	1 ml

Tampão C:

- fosfato (pH 4,3 - 0,2 M)
- NaH_2PO_4 27,8 g
- H_2O até 1000 ml

Tampão D:

- fosfato (pH 9,2 - 0,2 M)
- Na_2HPO_4 53,63 g
- H_2O até 1000 ml.

O α -naftil acetato era dissolvido em etanol

e água na proporção de 1 g do sal, 50 ml de etanol e 50 ml de água.

O gel era mantido na solução de revelação durante 1 hora a 37°C.

O sistema das leucinas aminopeptidases (Lap) foi revelado pela técnica de BECKMAN & JOHNSON (1964), modificada:

Tampão Tris maleato (pH 5,2 - 0,2 M)	50 ml
L-leucil β naftilamida HCl	2,0 mg
Black K salt	25 mg

Dissolvia-se o substrato (L-leucil β naftilamida) em 5 ml de solução de metanol (10%), cinco minutos antes do uso.

O gel era deixado em solução reveladora por 1:30 horas a temperatura ambiente.

O sistema das malato desidrogenases (Mdh) foi revelado pela técnica de BREWER & SING (1970) modificada:

NAD	33 mg
PMS	3 mg
NBT	12,5 mg
Tampão Tris DL-málico	50 ml

Tampão Tris DL-málico (feito na hora da revelação):

- ácido DL-málico	1,38 g
- Tris	303 mg
- H ₂ O	50 ml

- Ajustar o pH 7 com NaOH.

O gel era deixado em solução reveladora, no escuro, durante 1:30 horas.

O sistema das peroxidases (Per) foi revelado pela técnica de BREWBAKER et alii (1968), modificada:

O-dianisidina	100 mg
Etanol (95%)	35 ml
Tampão fosfato	14 ml
H ₂ O ₂ (1%)	1 ml

Tampão fosfato (pH 6 - 1 M)

- KH ₂ PO ₄	109,0 g
- K ₂ HPO ₄	34,8 g
- H ₂ O	até 1000 ml
- Ajustar o pH 6 com NaOH.	

O gel era deixado em solução reveladora por 1 hora em temperatura ambiente.

Após a revelação, os géis eram lavados e fixados em solução de H₂O, álcool metílico e ácido acético na proporção 5:5:1 por cerca de 15 minutos. E posteriormente eram analisados e guardados, envoltos em plástico, na geladeira a 4°C.

e. Análise dos zimogramas

Após a fixação dos géis, feita de preferência no mesmo dia, fazia-se a "leitura" do gel, que corresponde a análise de cada sistema enzimático obtido na revelação. Cada gel era esquematizado em papel milimetrado, anotando as ban-

das com seu respectivo R_m (migração relativa). O R_m de cada sistema enzimático era obtido, pela divisão da distância migrada por uma molécula enzimática qualquer pela distância migrada pela banda padrão. A banda padrão de cada sistema era escolhida por sua alta frequência, constância e nitidez em todos os indivíduos. O uso de uma banda padrão fixada permite comparar cada banda de um indivíduo com uma banda do próprio indivíduo que teve as mesmas condições de migração decorrentes da localização no gel.

O R_m permite fazer uma homologia das bandas presentes em diferentes tecidos de um mesmo indivíduo ou em indivíduos diferentes, entre condições ambientais, populações e períodos diferentes em que é feita a análise. Foi com o R_m calculado para cada banda de cada sistema enzimático, obtido criteriosamente após um número representativo de indivíduos e géis analisados, que observou-se a segregação e determinaram-se os locos de cada sistema enzimático analisado.

f. Análise da segregação isoenzimática

Com o objetivo de se conhecer a ação gênica de cada banda dos diferentes sistemas enzimáticos, foi realizada a análise, de diferentes tecidos por indivíduo e foi feita a comparação entre famílias (linhagens), que por serem preferencialmente autógamias apresentavam um padrão comum na análise feita em 20 progênies de 50 famílias.

Para complementar este estudo foi feita análise também de gerações parentais, F_1 e F_2 , obtidas em casa de vegetação, o que possibilitou comparar o padrão de cada geração de uma mesma família e determinar a segregação de cada loco. Parte dos locos determinados, já eram considera-

dos como tais por seu padrão de segregação uniforme observado depois de mais de 100 indivíduos analisados e ainda pelo padrão de atividade de suas bandas sempre uniformes dentro de cada loco.

3.2.3. Análise dos resultados da análise isoenzimática das populações naturais

a. Variabilidade intrapopulacional

A variabilidade genética das populações se baseia na frequência alélica de cada loco da população. O grau de variabilidade gênica dentro de cada população foi estimado basicamente em função das medidas:

A = número médio de alelos por loco;

P = proporção de locos polimórficos por população;

H = diversidade gênica (heterozigosidade média).

Em relação à frequência alélica de cada loco da população, foram estimadas também as variâncias (s^2), ($\bar{s}^2$), índice de fixação médio ($\bar{F}$) e coeficiente de endogamia efetiva ($\bar{F}_e$).

A heterozigosidade (h) de um loco é definido como $h = 1 - \sum x_i^2$, onde x_i é a frequência do $i^{\text{ésimo}}$ alelo. Heterozigosidade média (H) é a média desses valores em relação ao total de locos examinados (NEI, 1975).

As três medidas de variabilidade genética (A, P e H), obtidas para as 25 populações e 5 sistemas enzimáticos, foram mais exploradas por uma análise de variância de dupla entrada. Para A e P foi utilizada análise de variân-

cia de dupla entrada sem replicação, mas não foram testadas com F porque a distribuição dos dados não permitia. Para H, foi feita a análise da variância de dupla entrada com sub-classes desiguais, mas proporcionais (SOKAL & ROHLF, 1969). O teste de médias para H entre populações foi o de Scheffé (GOMES, 1985).

As estimativas baseadas nas frequências alélicas médias por loco tiveram o objetivo de fornecer elementos de informação da variabilidade do conjunto de populações de uma região. As estimativas são feitas por loco. Além da variância entre as frequências alélicas, estimou-se a variância média ($\bar{s}^2$), que é definida como $\bar{s}^2 = \bar{p}(1 - \bar{p})/\bar{n}$, onde $\bar{p}$ é a frequência média do alelo e $\bar{n}$ é o número médio de alelos na amostra (SELANDER & KAUFMAN, 1975). Por se tratar de plantas que provavelmente não são alógamas e nem completamente autógamas, foi estimado o índice de fixação médio ($\hat{F}$), que se define como $\hat{F} = 1 - \bar{h}/2\bar{p}\bar{q}$, onde $\bar{h}$ é a proporção média de locos heterozigotos, e o coeficiente de endogamia efetiva ($\hat{F}_e$) que foi definido como:

$$\hat{F}_e = \frac{s^2p}{\bar{p}(1 - \bar{p})}, \quad \text{onde}$$

s^2p é a variância do alelo p entre as populações e $\bar{p}$ é a frequência média do alelo p (SELANDER & KAUFMAN, 1975).

b. Distância genética entre populações

As divergências interpopulacionais foram calculadas utilizando o índice de identidade gênica normalizado de NEI (1972), que se baseia nas frequências alélicas de locos homólogos. Assim, considerando as populações X e Y, com a frequência x_i e y_i do $i^{\text{ésimo}}$ alelo em X e Y, respectivamente, a probabilidade de identidade de dois genes escolhi-

dos ao acaso é $jX = \sum x_i^2$, na população X e $jY = \sum y_i^2$ na população Y. A probabilidade de identidade de um gene da população X e um gene da população Y é $jXY = \sum x_i y_i$. A identidade normalizada dos genes, entre as populações X e Y em relação a todos os locos é definida por NEI (1972) como:

$$I = JXY / \sqrt{JXJY}$$

onde JX, JY e JXY são as médias aritméticas de jX , jY e jXY , respectivamente, sobre todos os locos incluindo os monomórficos. O valor de I (identidade genética), varia de 0 a 1, com $I = 1$ quando todas as frequências alélicas são iguais nas duas populações e $I = 0$ quando as duas populações não têm alelos em comum.

A distância genética (D) entre 2 populações é então o logaritmo negativo da identidade genética entre eles, ou seja:

$$D = - \log_e I.$$

A significância das diferenças nas medidas de distância genética entre as 25 populações de *S. humilis* foi testada através da distância genética mínima (D_m) entre populações (NEI & ROYCHOUDHURY, 1974):

$$D_m = (JX + JY) / 2 - JXY$$

Esta medida possibilitou testar a hipótese de distância genética nula: $D_m = 0$ para cada loco através do χ^2 :

$$\chi^2 = n_x n_y \sum_i \frac{(x_i - y'_i)^2}{x_i n_x + y_i n_y}$$

onde n_x e n_y são o tamanho das amostras (número de alelos em cada loco) de cada população e x_i e y_i são as frequências do $i^{\text{ésimo}}$ alelo nas duas populações. O número de graus de liberdade é igual ao número de alelos de cada loco menos 1.

3.2.4. Estimativas de taxa de cruzamento com marcadores isoenzimáticos

a. Taxa de cruzamento de populações em equilíbrio endogâmico

Numa população endogâmica em equilíbrio com alelos neutros em cada loco, o total de heterozigosidade em qualquer geração é diretamente relacionada ao coeficiente de endogamia F . Entretanto, se fatores além da endogamia (como a seleção) afetam a relação entre as frequências gênicas e genotípicas, seus efeitos combinados podem ser representados pelo índice de fixação ($\hat{F}$), que é definido como o total de heterozigose observada em relação a heterozigose esperada em cruzamentos ao acaso (WRIGHT, 1965):

$$\hat{F} = 1 - h/2 \hat{p}\hat{q} ,$$

onde, h é a frequência de heterozigotos e $\hat{p}$ e $\hat{q}$ as frequências alélicas estimadas do loco. $\hat{F}$ foi estimado para cada loco e para cada população que tivesse uma amostragem efetiva ($N \geq 25$). A variância de $\hat{F}$ foi estimada para obter o desvio padrão médio de $\hat{F}$ de cada população segundo RASMUSSEN (1964).

$$\text{Var}(\hat{F}) \cong \frac{(1 - 2\hat{F})(1 - \hat{F})^2}{N} + \frac{\hat{F}(1 - \hat{F})(2 - \hat{F})}{2 \hat{p} \hat{q} N}$$

A autofertilização altera o equilíbrio de Hardy-Weinberg e esta alteração pode ser determinada pelo

($\hat{F}$), que pode ser usado como base para estimar o total de autofertilização. Após várias gerações de fertilização ou em populações naturais estáveis, F ficará dentro dos limites de $F = (1 - t/1 + t)$, sendo t a taxa de cruzamento. Quando este limite está próximo de atingir o equilíbrio endogâmico, pode-se estimar a taxa de cruzamento com base no coeficiente de endogamia F (NEI & SYAKUDO, 1958):

$$\hat{t} = (1 - \hat{F}) / (1 + \hat{F})$$

Para se obter o desvio padrão de ($\hat{t}$) (taxa de cruzamento estimada) de cada população, foi calculada a variância de $\hat{t}$ (RASMUSSEN, 1964):

$$\text{Var } (\hat{t}) \approx \frac{4}{(1 + \hat{F})^4} \text{Var } (\hat{F}).$$

A heterogeneidade dos valores de $\hat{t}$ entre os diversos locos examinados, foi testada pelo teste χ^2 , que é definido por JAIN (1979):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k (\hat{t}_i - \bar{\hat{t}})^2 / S_i^2,$$

onde,

$$\bar{\hat{t}} = \sum_i (\hat{t}_i / S_i^2) / \sum_i \frac{1}{S_i^2},$$

calculado para o $i^{\text{ésimo}}$ loco de uma amostragem k , com a variância S^2 . Esta heterogeneidade expressa por χ^2 tem $(k-1)$ graus de liberdade.

b. Taxa de cruzamento obtida de ensaios com gene marcador

É o método mais comum, usado principalmente para obter a taxa de cruzamento usando marcadores fenotí-

picos com dominância. A taxa de cruzamento é expressa simplesmente pela proporção de tipos heterozigotos entre os homozigotos - RR (recessivos), os quais são intercalados no campo com os tipos homozigotos alternativos - LL (dominantes). Entretanto, existe nos descendentes, cruzamentos não detectáveis (pt), sendo p a frequência alélica do alelo - R (recessivo) e t a taxa de cruzamento, dentro das plantas - RR (recessivas). Para compensar este tipo de cruzamento intragenotípico, JAIN (1979) propôs $\hat{t} = h/\hat{p}$, onde h é a proporção de heterozigotos na progênie dos genótipos homozigotos (aa ou RR) e $\hat{p}$ a frequência do alelo alternativo (A ou L).

Para determinar a taxa de cruzamento usando esta metodologia, foi realizado um ensaio formado por um bloco isolado em Anhembi, Piracicaba, planejado, coletado e analisado com base num gene marcador E_1 , conforme o esquema:

1 o LL	2 o RR	3 o LL	4 o RR
8 o RR	7 o LL	6 o RR	5 o LL
9 o LL	10 o RR	11 o LL	12 o RR
16 o RR	15 o LL	14 o RR	13 o LL

onde as plantas de genótipos homozigotos LL e RR foram intercaladas a uma distância de 1,0 m, tendo havido o cuidado de se uniformizar pela poda, a parte aérea de cada planta no período de floração.

Foram analisados os descendentes (progênie)

dos dois genótipos maternos (LL e RR) de plantas individuais coletadas em 5 períodos, sendo a primeira coleta no início da floração e a quinta no fim da floração. As plantas proporcionalmente amostradas forneceram a frequência alélica de R e de L bem como a proporção de heterozigotos de cada genótipo.

Além da taxa de cruzamento dos dois genótipos homozigotos alternativos do gene marcador E_1 observada nas progênie foi estimado também o desvio padrão (s) através da variância de $\hat{t}$ para cada genótipo parental (ALLARD & WORKMAN, 1963):

$$s^2(\hat{t}) = \frac{H(1-H)}{\hat{p}^2 N_1} + \frac{H^2(1-\hat{p})}{\hat{p}^3 N_2}$$

onde N_1 é o número total da progênie de (LL ou RR) e N_2 é o tamanho da amostra usada para estimar p (alelo alternativo do genótipo considerado).

c. Taxa de cruzamento em populações naturais

Uma informação da taxa de cruzamento mais precisa e real foi obtida pela análise da segregação da progênie de genótipos maternos conhecidos. O uso da estrutura familiar para estimar a taxa de cruzamento é eficiente, pois cada família representa em última análise a repetição de um ensaio dentro de uma população natural.

Para determinar a taxa de cruzamento em populações naturais foram escolhidos dois genes marcadores (E_1 e E_2) pela facilidade de análise e três populações, uma de cada região ecogeográfica, a que apresentasse maior variabilidade alélica em um ou em ambos os genes marcadores.

O número de famílias analisadas por população esteve na dependência do número de progênie necessárias para identificar os genótipos maternos com uma precisão acima de 95% e do número de famílias disponíveis de genótipos apropriados dentro da amostra da população.

Os genótipos maternos foram inferidos através da frequência genotípica da progênie familiar seguindo a metodologia de BROWN & ALLARD (1970) e BROWN (1975). Assim, para o genótipo materno de um loco homozigoto (LL), pode-se ter 2 tipos possíveis de genótipos da progênie: LL e RL com a frequência de p e q respectivamente (p = frequência de L e q = frequência de R). Cada genótipo da progênie recebe pelo menos um alelo (gameta feminino) materno e o outro alelo (gameta masculino) pode ser originário da planta mãe (autofertilização) ou pode ser originário de uma outra planta (cruzamento). Os genótipos da progênie dentro de uma família, depende da frequência dos genótipos maternos e do conjunto gênico do pólen na população e da taxa de cruzamento. De cada população analisada foram estimados os genótipos maternos e a frequência gênica do pólen (p') que fertilizou os genótipos das famílias analisadas e com isto pode-se estimar a taxa de cruzamento por família em cada loco analisado e com isto obteve-se o $\hat{t}$ da população.

A metodologia usada para obter a taxa de cruzamento e a frequência alélica do conjunto de pólen foi a de BROWN et alii (1975), que é apropriada para amostras de plantas maternas limitadas. Se o loco marcador segrega para 2 alelos (R e L), com a frequência do pólen de p' e $q' = (1-p')$, e supondo que a progênie:

N_{11} = descendentes de mães RR;

N_{22} = descendentes de mães LL;

N_{12} = descendentes RR ou LL de mães RL;

os descendentes heterozigotos RL de famílias heterozigotas RL são excluídas da análise porque as progênies RL de mães RL não são precisas na informação a respeito dos valores paramétricos de t e p' . Esta metodologia exige dados obtidos pelo menos de 2 genótipos maternos, por isto os genótipos maternos utilizados em cada população foram sempre de 2 tipos para cada gene marcador.

Para cada tipo de genótipo materno utilizado foi escolhida a metodologia própria para estimar t (taxa de cruzamento), p' (frequência alélica do conjunto de pólen) e suas respectivas variâncias (BROWN et alii, 1975).

3.2.5. Análise da relação morfo-isoenzimática e ambiental

Quantificar o valor adaptativo de genótipos isoenzimáticos e estabelecer um paralelo entre as variáveis isoenzimáticas, morfológicas e ambientais como resultado da seleção de populações de *S. humilis* estabelecidas e adaptadas em condições ecogeográficas contrastantes, foram as metas estabelecidas e testadas, mediante ensaio de campo estabelecido em Anhembi, Piracicaba. O ensaio foi em blocos casualizados tendo 20 tratamentos escolhidos a partir das informações ecogeográficas e genéticas (isoenzimáticas).

Além das informações de características do material na coleta como tipos de inflorescência de distribuição e de ocorrências, foram analisados mais 10 caracteres morfológicos, obtidos a partir do ensaio de campo em Anhembi, Piracicaba, que foram: tipos de inflorescência e pilosi-

dade, quantificados no início da maturação da semente, idade de início de florescimento, comprimento do pecíolo foliar, comprimento do internódio, folíolo central (índice), folíolo lateral (índice), área basal, peso de matéria verde e peso de matéria seca, todos estes quantificados no início do florescimento.

Foi utilizada análise de variância fazendo o uso de contrastes entre tratamentos (STEEL & TORRIE, 1980), possibilitando comparações múltiplas. Este tipo de análise com os contrastes previamente estabelecidos, permitiu testar as diferentes hipóteses relacionando os fatores ecogeográficos (ambientais) de origem com os genéticos (isoenzimáticos).

Para complementar estas informações, foi feita análise de regressão entre a precipitação pluviométrica anual do local de cada população, com a porcentagem de diversidade (H) e de locos polimórficos (P) de cada população, sendo calculados a significância de b, o coeficiente de determinação r^2 e o coeficiente de correlação r e sua significância (SOKAL & ROHLF, 1969).

Finalmente, foi testada uma relação mais estreita entre o padrão genético, de heterozigosidade e do alelo comum mais frequente, obtido de 11 locos isoenzimáticos e valores de produtividade, como matéria seca. Para isto foram comparados dois grupos de plantas, de produção superior e inferior, das quais se obteve o padrão genético prévio por planta. Com base nos dados de produção de matéria seca obtidos no ensaio de campo em Anhembi, Piracicaba, foi realizada a análise de variância de blocos casualizados com mais de uma amostra por parcela (STEEL & TORRIE, 1980).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Variabilidade genética em populações naturais de Stylosanthes humilis

A organização da variabilidade genética dentro das populações, tem a função de propiciar a adaptação imediata e também a flexibilidade para as necessidades futuras. As estimativas de variação genética apresentadas neste trabalho, foram obtidas do padrão isoenzimático.

A Figura 2 ilustra esquematicamente os padrões eletroforéticos que apresentaram boa atividade e cujos locos foram determinados para cada um dos cinco sistemas estudados.

A frequência alélica de 20 locos obtidos da análise em cinco sistemas enzimáticos e três tecidos de *Stylosanthes humilis* pertencentes a 25 populações de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco estão apresentadas na Tabela 2. Esta tabela mostra que dos 20 locos analisados, 15 apresentaram polimorfismo (frequência alélica superior a 1% na população), na grande maioria das populações.

Dos 20 locos analisados, três deles P_4 , P_5 e P_6 , possuem três alelos cada um, o alelo de migração rápida

FIGURA 2. Zimogramas dos padrões eletroforéticos, representando os alelos de 20 locos dos 5 sistemas enzimáticas analisados em sementes (Est), plântulas (Cat, Lap, Mdh), cotilédono e raiz (Per), de 25 populações de *S. humilis* do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

TABELA 2. Frequência alélica, migração relativa (Rm), teste de homogeneidade (χ^2), de 20 locos obtidos de 5 sistemas enzimáticos (Cat, Est, Lap, Mdh, Per) de 3 tecidos (sementes (s), folhas cotiledonais (c) e raiz (r)) em 25 populações coletadas em 3 regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Locos	Tecidos	Alelos	Rm	Populações																Teste de significância (χ^2)										
				Zona da Mata				Zona do Agreste				Zona do Sertão																		
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		Q	R	S	T	U	V	X	Y	Z	
C ₁	c	1 (1,00)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	ns		
C ₂	c	1 (-0,17)	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,21	0,07	0,18	0,27	0,21	0,17	0,29	0,71	0,68	0,86	0,83	0,80	0,83	0,16	0,17	0,08	0,12	0,00	0,00	0,34	**	
C ₃	c	2 (-0,25)	1,00	1,00	1,00	0,65	1,00	1,00	0,79	0,82	0,73	0,79	0,79	0,82	0,71	0,85	0,83	0,96	0,83	0,80	0,83	0,84	0,83	0,92	0,88	1,00	0,90	0,66	**	
C ₄	c	1 (-0,40)	0,83	0,76	0,86	0,19	0,18	0,18	0,50	0,21	0,15	0,56	0,50	0,31	0,13	0,05	0,34	0,17	0,25	0,12	0,23	0,33	0,56	0,82	0,54	0,02	0,20	0,88	**	
C ₅	c	2 (-0,43)	0,37	0,24	0,14	0,81	0,82	0,50	0,79	0,85	0,34	0,50	0,59	0,69	0,87	0,95	0,66	0,83	0,65	0,88	0,77	0,67	0,44	0,18	0,46	0,98	0,80	0,92	**	
E ₁	s	1 (1,00)	0,79	0,37	0,05	1,00	1,00	1,00	0,72	0,83	0,67	1,00	0,82	0,59	0,96	1,00	0,98	0,92	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**	
E ₂	s	2 (0,96)	0,21	0,63	0,85	0,00	0,00	0,28	0,17	0,33	0,00	0,12	0,41	0,04	0,00	0,00	0,02	0,08	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**	
E ₃	s	1 (0,89)	0,90	0,84	0,97	1,00	1,00	1,00	0,96	0,87	0,71	0,85	0,83	0,96	0,93	0,84	0,92	0,84	0,74	0,92	0,80	0,01	0,85	0,83	0,90	0,87	0,96	0,96	ns	
E ₄	s	2 (0,83)	0,10	0,16	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,13	0,29	0,15	0,17	0,04	0,07	0,16	0,08	0,16	0,26	0,08	0,20	0,19	0,15	0,17	0,10	0,13	0,04	ns	
E ₅	s	1 (-0,10)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	ns	
E ₆	s	1 (-0,23)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	ns	
L ₁	c	1 (1,00)	0,56	0,42	0,10	0,10	0,10	0,15	0,61	0,50	0,73	0,63	0,78	0,80	0,73	0,84	0,81	0,83	0,67	0,64	0,41	0,54	0,32	0,52	0,42	0,44	0,40	0,40	**	
L ₂	c	2 (0,90)	0,44	0,58	0,90	0,90	0,85	0,90	0,39	0,50	0,27	0,37	0,22	0,20	0,27	0,16	0,19	0,17	0,33	0,36	0,59	0,46	0,68	0,48	0,58	0,56	0,60	0,60	**	
L ₃	c	1 (0,82)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**	
L ₄	c	2 (0,78)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**	
X ₁	c	1 (1,15)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**	
X ₂	c	2 (1,10)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**	
X ₃	c	1 (1,00)	0,37	0,66	1,00	0,90	0,90	0,84	0,78	0,37	0,93	0,74	0,66	0,89	0,83	0,82	0,91	0,92	0,84	0,74	0,72	0,96	0,85	0,85	0,63	0,59	0,72	0,72	ns	
X ₄	c	2 (0,95)	0,63	0,34	0,00	0,10	0,11	0,22	0,63	0,07	0,26	0,34	0,11	0,17	0,18	0,09	0,09	0,03	0,16	0,36	0,26	0,28	0,04	0,15	0,15	0,37	0,41	0,23	ns	
X ₅	c	1 (0,09)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	ns	
P ₁	r	1 (1,00)	0,90	0,92	0,97	0,90	0,83	0,84	0,88	1,00	1,00	0,90	0,82	0,96	0,85	0,89	0,94	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	ns
P ₂	r	2 (0,92)	0,10	0,08	0,03	0,10	0,17	0,06	0,12	0,00	0,10	0,18	0,04	0,15	0,11	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	**
P ₃	r	1 (0,85)	1,00	1,00	1,00	0,88	0,96	0,97	0,50	0,88	0,88	0,73	0,81	0,50	0,64	0,81	1,00	0,88	0,93	0,85	0,87	0,83	0,50	0,73	0,50	0,64	0,96	0,96	**	
P ₄	r	2 (0,80)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	ns	
P ₅	r	1 (0,19)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	ns	
P ₆	r	2 (-0,08)	0,10	0,37	0,22	0,25	0,26	0,17	0,08	0,27	0,13	0,05	0,10	0,06	0,00	0,06	0,06	0,17	0,12	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**	
P ₇	r	2 (-0,13)	0,67	0,45	0,68	0,51	0,54	0,28	0,29	0,35	0,66	0,45	0,14	0,33	0,50	0,36	0,42	0,49	0,55	0,62	0,30	0,50	0,44	0,55	0,67	0,67	0,82	0,82	**	
P ₈	r	3 (-0,24)	0,23	0,48	0,10	0,24	0,20	0,55	0,63	0,38	0,21	0,50	0,76	0,61	0,50	0,53	0,41	0,39	0,28	0,38	0,70	0,50	0,56	0,45	0,33	0,33	0,18	0,18	**	
P ₉	r	2 (-0,42)	0,79	1,00	1,00	0,78	0,58	0,44	0,67	0,63	0,49	0,48	0,63	0,48	0,41	0,69	0,59	0,66	0,58	0,56	0,68	0,75	0,53	0,60	0,73	0,75	0,78	0,78	**	
P ₁₀	r	3 (nulo)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**	
P ₁₁	c	1 (0,82)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	ns	
P ₁₂	c	2 (0,77)	0,83	0,92	1,00	1,00	1,00	1,00	0,94	1,00	0,83	1,00	0,97	0,79	0,83	0,98	0,91	0,67	0,73	0,93	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**
P ₁₃	c	3 (0,72)	0,19	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	ns	
P ₁₄	c	1 (-0,16)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**	
P ₁₅	c	2 (-0,25)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**
P ₁₆	c	1 (-0,37)	0,12	0,68	0,28	0,17	0,42	0,61	0,42	0,65	0,48	0,59	0,11	0,08	0,07	0,07	0,07	0,18	0,25	0,18	0,50	0,62	0,41	0,50	0,03	0,25	0,36	0,18	ns	
P ₁₇	c	2 (-0,41)	0,88	0,32	0,72	0,83	0,58	0,39	0,58	0,35	0,52	0,41	0,89	0,92	0,93	0,83	0,75	0,82	0,82	0,50	0,38	0,59	0,50	0,97	0,75	0,88	0,64	0,82	ns	

** - significância ao nível de 1% pelo teste de homogeneidade (χ^2).

ns - não significativo.

(1), intermediária (2) e lenta (3). No P_5 o alelo (3) corresponde ao alelo nulo, que é a ausência de atividade numa aloenzima. A ausência de atividade catalítica do alelo nulo, não implica em neutralidade funcional da enzima na população. Para os demais locos polimórficos da Tabela 2, são mostrados dois alelos, o de Rm rápida (1) e lenta (2).

O número relativamente alto de bandas nas peroxidases (Tabela 2), 8 locos e 18 alelos, é uma constatação observada na maioria dos gêneros de plantas, possivelmente em decorrência de suas diferentes atividades fisiológicas. No milho, por exemplo, que é uma das plantas mais estudadas por eletroforese de isoenzimas, foram detectados só nas Peroxidases, 9 locos e 26 alelos, sendo 5 nulos (BREWBAKER & HASEGAWA, 1975).

As frequências gênicas e genotípicas, determinam a composição genética de populações e alterações nestas frequências constituem a base dos processos evolutivos. Para comparar populações da mesma espécie é necessário transformar as frequências alélicas dos locos em números que indiquem a variação na população.

A homogeneidade da distribuição da frequência alélica entre as populações foi testada pelo χ^2 (Tabela 2) constatando-se não haver distribuição homogênea em 10 dos 15 locos polimórficos. Esta heterogeneidade, como será visto adiante, pode ter diversas causas, como a heterogeneidade ambiental e a estrutura populacional que pode estar constituída por um conjunto de populações geneticamente diferenciadas.

Na Tabela 3 pode-se observar os elementos básicos da variação nas 25 populações. Nela estão expressos o número de locos polimórficos com frequência alélica igual ou

TABELA 3. Número de locos polimórficos (dos 20 analisados) e número total de alelos de 25 populações de *S.humilis*, com média, desvio padrão ($\bar{s}$) e amplitude de cada região ecogeográfica do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Populações	Número de locos polimórficos ($\geq 5\%$)	Número de alelos	
		($\geq 5\%$)	($\geq 1\%$)
A	10	31	31
B	9	30	30
C	10	29	31
D	11	31	32
E	9	29	30
Mata: Média $\pm s$	9,8 $\pm$ 0,84	30,0 $\pm$ 1,00	30,8 $\pm$ 0,84
Amplitude	9 - 10	29 - 31	30 - 32
F	12	33	33
G	14	34	35
H	14	36	37
I	12	33	34
J	15	35	37
K	15	35	37
L	15	35	38
M	14	33	34
N	15	35	36
O	10	32	32
Agreste: Média $\pm s$	13,6 $\pm$ 1,71	34,1 $\pm$ 1,28	35,3 $\pm$ 2,00
Amplitude	10 - 15	32 - 36	32 - 38
P	14	36	37
Q	14	36	36
R	13	33	33
S	12	31	33
T	13	30	33
U	13	33	34
V	13	34	34
X	13	33	34
Y	14	35	35
Z	13	31	34
Sertão: Média $\pm s$	13,2 $\pm$ 0,63	33,2 $\pm$ 2,10	34,3 $\pm$ 1,34
Amplitude	12 - 14	30 - 36	33 - 37

superior a 5% e o número de alelos nos locos polimórficos a nível igual ou superior a 5% e a 1%. Seus valores mostram a existência de diferenças entre populações, mesmo sendo da mesma região, o que vem comprovar baixos níveis de fluxo gênico entre essas populações, principalmente entre regiões diferentes e entre populações de beira de rodovias com as de regiões de pastagens naturais afastadas das estradas. Nesta tabela, bem como nos gráficos da Figura 3, são mostrados um número de locos polimórficos e número de alelos, menor na zona da Mata, aumentando os valores e as amplitudes na zona do Agreste para reduzir um pouco os valores e principalmente as amplitudes na zona do Sertão. A oscilação nas amplitudes dos locos e alelos do Sertão restringe-se praticamente às populações fora da rodovia (populações S, T, U, V, X, Z), as quais possuem valores menores.

A Figura 3 mostra que o aumento de locos polimórficos implica quase necessariamente no aumento de alelos, o que era de se esperar, tendo em vista serem 80% dialélos. E ainda, observa-se que no Agreste estão as maiores médias e maiores oscilações de amplitude, apesar de sua menor área e distâncias entre suas populações. A maior amplitude parece se relacionar com a maior oscilação ambiental (clima, altitude, precipitação, etc.). E médias maiores parecem satisfazer as exigências da imprevisibilidade das condições desta região, que é, junto com a do Sertão, considerada centro de diversidade da espécie.

A frequência de um alelo particular depende do aumento ou diminuição da adaptação do genótipo total ao qual este alelo pertence. A seleção natural atua sobre o fenótipo como um todo e os alelos de locos particulares são favorecidos ou não de conformidade com seu valor adaptativo relativo com que participa na expressão do fenótipo. As Fi-

FIGURA 3. Distribuição geográfica no sentido N-S (149 km) e L-O (472 km) do número de locos polimórficos (dos 20 analisados) e número de alelos de 25 populações de *S. humilis* coletadas nas 3 regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Figuras 4 a 18 ilustram a frequência alélica nas 25 populações, distribuídas nos dois sentidos Norte-Sul e Leste-Oeste, onde é considerada a frequência dos alelos e a distância geográfica das populações ao longo das três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Cada uma destas 15 figuras ilustra um dos 15 locos polimórficos.

A proporção relativa com que cada um destes locos participa na adaptação, sobrevivência e colonização de novos ambientes, não é fácil de se determinar. Isto primeiramente porque, além do gene não atuar isoladamente, pouco se conhece ainda da função fisiológica e metabólica específica da maior parte das isoenzimas. E em segundo lugar a ação de cada gene não é constante, dependendo de outros fatores ambientais e genéticos, considerando ainda que a atividade da maioria das enzimas é restrita a determinadas fases do ciclo de vida da planta. Entretanto, quer seja pela função metabólica específica da enzima, quer seja pela atuação conjunta destas enzimas ou ainda por sua participação em complexos gênicos onde estes locos enzimáticos se encontram ligados a locos de caracteres fisiológicos altamente adaptativos, sua distribuição ecogeográfica expressa nas Figuras 4 a 18, é bem caracterizada.

Analisando estes gráficos em seus aspectos gerais, o que mais chama a atenção é a grande oscilação das linhas que representam as frequências de cada alelo do loco entre as populações do Agreste. Esta variação acentuada em relação às outras duas regiões, é bem mais expressiva quando se considera a aproximação entre as populações da menor região estudada e sabendo que são todas populações pertencentes a beira de rodovia. A função da seleção natural em ambientes heterogêneos parece ser preponderante e decisiva, superior mesmo ao possível fluxo que possa ter ocorrido através de máquinas na construção e manutenção das rodovias.

FIGURA 4. Frequência alélica da C_2 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 5. Frequência alélica da C_3 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos no Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 6. Frequência alélica da E_1 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 7. Frequência alélica da E_2 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 8. Frequência alélica da L_1 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 9. Frequência alélica da L₂ em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da Zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 10. Frequência alélica da M_1 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 11. Frequência alélica da M_2 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 12. Frequência alélica da P_1 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 13. Frequência alélica da P_2 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 14. Frequência alélica da P_4 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 15. Frequência alélica da P_5 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 16. Frequência alélica da P_6 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 17. Frequência alélica da P_7 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E e se po sicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

FIGURA 18. Frequência alélica da P_8 em 25 populações de *S. humilis* distribuídas em dois sentidos do Estado de Pernambuco. As populações C, B, A, D, E se posicionam no sentido N-S ao longo da praia da zona da Mata, enquanto que as demais populações (20), estão dispostas no sentido L-O, iniciando no litoral (Recife), atravessa o Agreste e penetra no Sertão (caatinga), até 472 km do litoral. Piracicaba, SP, 1987.

O período curto de geração e a recombinação e fluxo gênico restritos que parecem prevalecer em *S. humilis*, devem levar a uma rápida fixação dos complexos gênicos melhor adaptados. Entretanto, ano após ano, com a variação e a instabilidade climática e ecológica, por ser uma espécie invasora, deve ser favorecida a seleção disruptiva que leva a diminuir as mudanças periódicas e aumentar a variação genética dentro de populações. Assim sendo, as diferenças que se observam, presumivelmente representam mudanças no passado que ocorreram em diferentes períodos de tempo (KANNEBERG & ALLARD, 1967).

As Figuras 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 que representam todos os locos polimórficos analisados, com exceção apenas dos dois das esterases, também apresentam um aspecto em comum; que é uma nítida alteração de variação das frequências das populações S, T, U, V, X e Z, em relação as demais populações do Sertão. Como se observa na Tabela 1 (pag.36), estas populações são as representativas de áreas afastadas das rodovias, sendo provavelmente mais antigas e tendo sofrido menos alterações ambientais e genéticas via fluxo gênico ou deriva genética. Algumas dessas populações possuem os alelos dos locos C_2 , C_3 , L_2 , M_1 , M_2 , P_1 , P_2 , P_6 , P_7 e P_8 , fixados, quando, destes, apenas os locos P_1 e P_6 das demais populações do Sertão possuem alelos fixados. E ainda, nas Figuras 5, 8, 9 e 14, que representam os locos C_3 , L_1 , L_2 e P_4 , se observa um cruzamento das linhas das frequências alélicas, o que indica haver uma grande alteração das frequências em relação as outras populações da região. O alelo que mantinha a frequência mais alta passa para a frequência mais baixa e vice-versa.

Alelos que possuem uma alta distribuição lo-

calizada, segundo BROWN (1978), representam uma substancial fração da variação, entretanto, o mesmo alelo não é sempre responsável pelo aumento da heterozigosidade entre locais diferentes. Isto sugere que a heterozigosidade em si pode ser em muitos casos uma medida ecológica a mais que substitue a frequência gênica. O que vem confirmar WILLS (1973), que sugeriu haver uma associação entre adaptação e heterozigosidade isoenzimática por indivíduo, independentemente da presença de alelos enzimáticos particulares no polimorfismo funcional.

A heterogeneidade isoenzimática que melhor expressa a variabilidade genética nas populações através do número médio de alelos por loco A, proporção de locos polimórficos P e diversidade gênica H, está apresentada na Tabela 4 e ilustrada na Figura 19.

Os valores médios dos dados resultantes das informações de 20 locos analisados em 5 sistemas enzimáticos para cada população, enfatizam para todas as três medidas de variabilidade, aquilo que foi sugerido com os dados das frequências alélicas e totais de alelos e locos polimórficos. As médias do Agreste, tanto de A como de P e H, são superiores às das outras duas regiões (Tabela 4). O mesmo se pode afirmar do desvio padrão (s) das populações. O Sertão com uma variabilidade superior em relação a Mata, tem sua uniformidade quebrada apenas pelas populações afastadas da rodovia S, T, U, V, X e Z. Nem sempre estas três medidas da variabilidade andam paralelas. Assim, por exemplo, nas populações A, B, H, I, Q, T, U, V e Z (Figura 19), o aumento da percentagem de A e P ou sua redução tem o efeito contrário sobre H. Isto, além do fator compensatório na manutenção da variabilidade que é sugerido, a H em espécies de autofecundação ou mistas representa um índice de heterogenei-

TABELA 4. Variabilidade genética (A = número médio de alelos por loco; P = proporção de locos polimórficos; H = diversidade gênica) expressa em 20 locos isoenzimáticos de 5 sistemas e 25 populações de *S. humilis* de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

População	Localidade	Amostragem (N)	Medidas variabilidade genética		
			A	P	H
A	Janga-I	24	1,48	0,52	0,16
B	Janga-II	19	1,46	0,43	0,17
C	Paulo Amarelo	29	1,48	0,46	0,11
D	Tamandarê-I	36	1,54	0,51	0,17
E	Tamandarê-II	36	1,45	0,42	0,15
Região da Mata	Média $\pm$ s Total	28,80 144	1,48 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,02
F	Ser. Russas	09	1,55	0,52	0,25
G	Gravatá	12	1,74	0,71	0,26
H	Bezerros	20	1,79	0,71	0,21
I	Caruaru	31	1,69	0,69	0,24
J	São Caetano	37	1,79	0,74	0,26
K	Cachoeirinha	35	1,79	0,74	0,22
L	Belo Jardim-I	26	1,82	0,74	0,22
M	Belo Jardim-II	22	1,72	0,69	0,18
N	Sanharô	32	1,77	0,74	0,20
O	Pesqueira	06	1,55	0,50	0,16
Região do Agreste	Média $\pm$ s Total	23,00 230	1,72 $\pm$ 0,10	0,68 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,03
P	Arcoverde	41	1,79	0,71	0,22
Q	Sertânia	38	1,74	0,69	0,24
R	Flôres	43	1,67	0,66	0,23
S	Ser.Talhada-I	23	1,67	0,64	0,21
T	Ser.Talhada-II	24	1,67	0,66	0,19
U	Ser.Talhada-III	17	1,69	0,66	0,21
V	Santa Rita-I	46	1,65	0,62	0,23
X	Santa Rita-II	20	1,65	0,60	0,19
Y	S.J.Belmonte-I	35	1,72	0,62	0,23
Z	S.J.Belmonte-II	25	1,69	0,66	0,20
Região do Sertão	Média $\pm$ s Total	31,20 312	1,69 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,02
Total geral		686

FIGURA 19. Variação genética de 25 populações de *S. humilis* distribuídas em 25 locais nos sentidos Norte-Sul (149 km) e Leste-Oeste (472 km), no estado de Pernambuco, tendo como base 20 locos isoenzimáticos da análise de plan-tas individuais. Piracicaba, SP, 1987.

dade, ou diversidade gênica ou ainda índice de polimorfismo (MARSHALL & JAIN, 1969). Enquanto H representa a heterozigiosidade (variabilidade) real em relação a todos os locos analisados, A considera os alelos em si independentes de sua importância biológica e P que é o melhor guia do nível de variação genética numa amostra é muito dependente do tamanho da amostra e do número de enzimas pesquisadas.

São as propriedades bioquímicas de uma população que permitem adaptá-la a ambientes heterogêneos e condicioná-la ao estresse ambiental (GOTTLIEB, 1975). Estas propriedades, que se manifestam através das medidas de A, P e H, podem ter seus valores diferenciados em função das diferenças entre populações ou simplesmente como diferenças funcionais ou não, entre as enzimas.

A Tabela 5 apresenta o resumo da análise da variância de dupla entrada para os valores de A e de P com a finalidade de ter uma estimativa da variação de seus valores através da variância, desvio padrão e coeficiente de variação considerando a totalidade de seus dados. Variação a nível de alelos (A) por loco é bem menor do que a proporção de locos polimórficos (P). Isto tanto podemos constatar pelos valores dos quadrados médios como dos coeficientes de variação. Além disso, observa-se que a variação entre os sistemas enzimáticos é muito alta, o que mostra serem estes sistemas provavelmente independentes, seja no aspecto genético, funcional ou em ambos.

A diversidade gênica H foi testada através da análise da variância (Tabela 6) que mostrou haver diferenças altamente significativas entre os sistemas enzimáticos e diferenças significativas a nível de 5% entre as populações. As diferenças entre os sistemas enzimáticos, como foi visto

TABELA 5. Resumo da análise da variância de dupla entrada sem replicação e desvio padrão (s) para valores de variabilidade genética de 25 populações naturais de *S. humilis* do Estado de Pernambuco, analisadas através de 20 locos de 5 sistemas enzimáticos. Piracicaba, SP, 1987.

Fonte de variação	GL	A = número médio de alelos/loco		P = proporção de locos polimórficos	
		QM	s	QM	s
Populações	24	0,0666	0,26	0,0526	0,23
Sistemas enzimáticos	4	1,3870	1,18	1,0006	1,00
Resíduo	96	0,0199		0,0192	
Média		1,66		0,63	
CV (%)		8,48		22,00	

TABELA 6. Resumo da análise da variância de dupla entrada com subclasses desiguais mas proporcionais para os valores transformados em $\sqrt{x+0,5}$ de H (diversidade gênica), de 25 populações naturais de *S. humilis* do Estado de Pernambuco, analisadas com 20 locos de 5 sistemas enzimáticos. Piracicaba, SP, 1987.

Fonte de variação	GL	QM
Populações (P)	24	0,0124*
Sistemas enzimáticos (E)	4	0,0674**
P x E (interação)	96	0,0063ns
Resíduo	250	0,0109
Média		0,20
CV (%)		12,00

* significativo a 5% pelo teste F

** significativo a 1% pelo teste F

ns não significativo.

acima é uma ocorrência normal da própria constituição desta fonte de variação. Através desta análise observa-se também que não há interação significativa entre populações e sistemas enzimáticos. Isto leva a sugerir que as diferenças entre as populações se baseiam nas informações da heterozigossidade (h) a nível de locos.

Para o teste de médias entre as populações, estabeleceram-se hipóteses ecogeográficas para interpretar a significância das diferenças. O teste de Scheffé, apesar de ser conservador, mostrou serem significativas diversas das comparações (Tabela 7). A partir deste teste, constatou-se que a diversidade gênica mostrou ser mais significativa em função das diferenças de solos, altitudes, precipitação e períodos de precipitação pluviométrica, tamanho e extensão de coleta de amostras, ambientes de beira de rodovia e de pastagem, do que entre regiões geográficas propriamente ditas. Entre regiões, houve diferenças significativas apenas entre duas populações próximas D e E, de Tamandaré com duas populações centrais do Agreste I e J e com duas populações características de beira de rodovia do Sertão Q e R. As diferenças de H entre as populações do Agreste são tão destacadas, que comparando duas a duas as populações das extremidades geográficas de cada região, as do Agreste mostraram diferenças significativas.

Estes dados sugerem que o polimorfismo, cuja expressão mais real é a diversidade H , é uma evidência da resposta imediata as condições locais. JOHNSON (1974), confirmou ser o polimorfismo de locos enzimáticos não seletivamente neutro e sim relacionado as funções metabólicas e fisiológicas.

As diferenças significativas observadas na

TABELA 7. Resultados do teste de Scheffé para comparação dos contrastes de H (diversidade genética) entre populações naturais distribuídas em 3 regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Ambientes	Comparações Populações	$s\sqrt{(n-1) \cdot F \cdot \bar{V}(\bar{Y})}$	
		0,05	0,01
Regiões	Mata x (Agreste + Sertão)	0,160ns	0,175ns
Regiões	Agreste x Sertão	0,143ns	0,157ns
Transição região	(O+P) x (F+G)	0,320ns	0,350ns
Dentro regiões	(A+B) x (D+E)	0,320ns	0,350ns
	(F+G) x (N+O)	0,320*	0,350**
	(P+Q) x (Y+Z)	0,320ns	0,350ns
Entre região da	(D+E) x (I+J)	0,320*	0,350**
Mata e outras	(D+E) x (Q+R)	0,320*	0,350**
Entre rodovia e	(S+T+U+V+X) x (P+Q+R)	0,234*	0,256**
pastagens	(S+T+U) x (V+X)	0,292ns	0,320ns
Tamanho amostr.	O x V	0,452*	0,495**
Extensão área	O x J	0,452*	0,495**
Precipitação	(A+B+C) x (G+J+K)	0,261*	0,286**
	G x (J+K)	0,392ns	0,429ns
Período	(F+I) x (L+M+O)	0,292*	0,320**
precipitação	(F+I) x (X+Y+Z)	0,292*	0,320**
	(F+I) x (A+B+C)	0,292*	0,320**
	F x I	0,452ns	0,495ns
Altitudes	(A+B+C) x (K+N+P)	0,261*	0,286**
	K x (N+P)	0,392ns	0,429ns
Tipos de solo:	(A+B+C+D+E+H+P+Y) x		
(classificação 2	(F+K+R+S+T+U+V+X)	0,160*	0,175**
Tabela 1)	(A+B+C+D+E) x (F+G+I+J+ N+Y+Z)	0,187*	0,205**
	(A+B+C+D+E+H+P+Y) x		
	(G+I+L+M+O+Q)	0,173*	0,189**
	(F+K+R+S+T+U+V+X) x (P+Z)	0,253ns	0,277ns
(classificação 3	(F+G+I+J+N+Y+Z) x		
Tabela 1)	(H+L+M+O+P+Q)	0,178*	0,195**
	(A+B+C+D+E) x (R+S+ T+U+V+X)	0,194*	0,212**
	(F+G+I+J+N+Y+Z) x K	0,342ns	0,374ns
$S_{0,05} (24,250) = 1,56$		$S_{0,01} (24,250) = 1,87$	

ns : não significativo

* : significativo a 5% pelo teste de Scheffé.

** : significativo a 1% pelo teste de Scheffé.

diversidade entre populações pelo tamanho da amostragem e pela extensão da área de populações da mesma região veio confirmar a hipótese sugerida por NEI *et alii* (1975). Segundo estes autores quando o tamanho da população é reduzido, espera-se que a heterozigosidade média por loco decline, e a taxa de declínio depende do tamanho efetivo da população, ao passo que se o tamanho da população aumenta espera-se que a heterozigosidade média também aumente devido a novas mutações. O pequeno tamanho da amostra coletada, reflete diretamente o tamanho real da população. Uma nova população pode se formar através de alguns imigrantes num território novo. Neste caso, espera-se que a heterozigosidade média da população, primeiro diminua para chegar a um valor mínimo (efeito "gargalo de garrafa") e então inicie o aumento a medida em que o tamanho da população se tornar suficientemente grande (NEI *et alii*, 1975). Esta mesma teoria pode também explicar as diferenças entre as populações D, E da Mata e I, J do Agreste e Q, R do Sertão (Tabela 7).

A variação genética em populações naturais geralmente envolve duas questões básicas. Inicialmente as questões concernentes ao nível da variação genética mantida dentro das populações, a qual deve estar associada a caracteres ligados a história vital, como as alterações geográficas e ecológicas, do sistema reprodutivo e período de fecundidade (ciclo de vida). Uma outra questão envolve a manutenção dos recursos genéticos que naturalmente e eficientemente ocorre em populações naturais, através da qual, pode-se entender como a variação genética é distribuída e quais características do ambiente ou da espécie influencia sua distribuição.

As Figuras 20 e 21 ilustram a distribuição dos locos polimórficos P nas 25 populações em função do nú-

FIGURA 20. Porcentagem de locos polimórficos (P) e o número médio de alelos por lo-
co (A) de 25 populações de *S. humilis* de três regiões ecogeográficas.
●: Mata; ○: Agreste; ▲ : Sertão; do Estado de Pernambuco. Piracicaba,
SP, 1987.

FIGURA 21. Porcentagem de locos polimórficos (P) e o índice de diversidade (H) de 25 populações de *S. humilis* de três regiões ecogeográficas: ●: Mata; o: Agreste; ▲: Sertão; do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

mero médio de alelos por loco A (Figura 20) e do índice de diversidade H (Figura 21). Nos dois casos é possível ver com bastante clareza o grau de relação e a distribuição das populações em relação a variabilidade. Nestas figuras está praticamente ilustrada a síntese dos resultados expostos sobre a variabilidade. Aqui verifica-se que as populações da Mata formam um bloco isolado de pontos próximos, as do Sertão um outro bloco também coeso mas com valores maiores e as populações do Agreste apresentam-se amplamente distribuídas, envolvendo as do sertão, ultrapassando estas com os valores extremos e também mantendo populações com níveis de variabilidade baixos que se equivalem as da Mata.

Estes resultados acrescidos com os que se seguem e principalmente os de distância genética vêm contribuir em favor da hipótese da seleção balanceada que relaciona a variabilidade isoenzimática a ambientes heterogêneos (AYALA et alii, 1972), e ainda sugere a distribuição das populações, quanto a sua diversidade, em centrais e marginais.

As estimativas de variabilidade são mais fortemente influenciadas por locos específicos. Alguns sistemas enzimáticos são mais monomórficos enquanto outros são mais polimórficos. Por isto, nas pesquisas feitas para comparar heterozigosidades, é dada maior importância ao número e tipo de locos analisados do que ao número de indivíduos amostrados.

Com exceção das Malato desidrogenases, que são mais relacionadas com o metabolismo energético, as demais (Esterases, Leucina aminopeptidases, Catalases e Peroxidases) são enzimas que fazem parte do metabolismo periférico, do grupo II, as quais refletem melhor as diferenças ambientais e são mais polimórficas que as do grupo I (GIL-

LESPIE & LANGLEY, 1974).

As Tabelas 8, 9 e 10 expressam estas diferenças enzimáticas a nível de loco. Cada uma destas três tabelas mostra dentro de cada região ecogeográfica a frequência alélica média ($\bar{X}$), variância (s^2), variância média ($\bar{s}^2$), índice de fixação médio ($\hat{F}$), heterozigosidade média ($\bar{h}$) (observada e esperada) e coeficiente de endogamia efetiva (F_e). Os valores individuais das estimativas de cada loco, mostram diferenças entre as três regiões que podem ser facilmente observadas e comparadas através das médias totais de todos os locos polimórficos examinados e de seus desvios padrões.

Excetuando as heterozigosidades, observada e esperada, as quais mostram valores médios maiores no Agreste, nas demais estimativas, a Mata mostrou valores médios superiores. Estes resultados vêm confirmar a não interação entre populações e sistemas enzimáticos, visto acima com (H). Os dados de variabilidade populacional foram no sentido oposto destes, isto é, o Agreste sempre com valores superiores e a Mata inferiores. Nestas Tabelas 8, 9 e 10, são as variâncias e variâncias médias de cada loco que são estimadas e estas representam uma descontinuidade a nível de gene, maior entre as populações da Mata. Em populações de espécie autó-gama, é bastante comum um alelo de baixa frequência em algumas populações mostrar uma alta frequência ou fixa em outras populações (NEVO, 1979), como se observa nas populações de *S. humilis* da Mata, levando a um aumento da sua variância.

O índice de fixação médio $\hat{F}$ e o coeficiente de endogamia efetiva F_e , que são relacionados com a taxa de cruzamento, seleção natural, variâncias e frequências dos alelos de cada loco, também são superiores na região da Mata. Estes fatores genéticos que diferenciam a Mata das outras

TABELA 8. Médias ($\bar{X}$), variâncias (s^2) e ($\bar{s}^2$), índice de fixação médio ($\bar{F}$), coeficiente de endogamia efetiva (F_e), heterozigosidade média ($\bar{h}$) observada e esperada com a significância pelo teste do (χ^2), das frequências alélicas de 14 locos enzimáticos polimórficos para 5 populações naturais de *S. humilis*, distribuídas no sentido Norte-Sul, na região da Mata do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1937.

Locos	Alelo	Frequência alélica média ($\bar{X}$)	Variância (s^2)	Variância média ¹ ($\bar{s}^2$)	Índice de fixação médio ($\bar{F}$)	Heterozigosidade ³ média ($\bar{h}$)			Coeficiente ⁴ de endogamia efetiva (F_e)
						esperada	observada	χ^2	
C ₂	R	0,070	0,024	0,0002	0,708	0,090	0,039	ns	0,369
	L	0,930							
C ₃	R	0,564	0,121	0,0008	0,736	0,296	0,130	**	0,491
	L	0,436							
E ₁	R	0,642	0,176	0,0008	0,913	0,178	0,040	**	0,764
	L	0,358							
E ₂	R	0,942	0,005	0,0002	0,744	0,102	0,028	**	0,089
	L	0,058							
L ₁	R	0,266	0,045	0,0007	0,836	0,318	0,064	**	0,228
	L	0,734							
M ₁	R	0,152	0,021	0,0004	0,721	0,222	0,072	**	0,165
	L	0,848							
M ₂	R	0,764	0,064	0,0006	0,928	0,260	0,026	**	0,351
	L	0,236							
P ₁	R	0,904	0,002	0,0003	0,562	0,170	0,076	*	0,022
	L	0,096							
P ₂	R	0,962	0,002	0,0001	0,371	0,070	0,046	ns	0,052
	L	0,038							
P ₄	R	0,240	0,007	0,0006	0,498	0,564	0,247	**	0,041
	I	0,570							
	L	0,190							
P ₅	R	0,830	0,025	0,0003	-	0,232	-		0,220
	L	0,042							
	N	0,128							
P ₆	R	0,000	0,007	0,0002	0,119	0,092	0,090	ns	0,147
	I	0,946							
	L	0,054							
P ₇	R	0,074	0,015	0,0002	0,504	0,112	0,068	ns	0,230
	L	0,926							
P ₈	R	0,334	0,051	0,0008	0,636	0,362	0,162	**	0,231
	L	0,666							
Média (14 locos)			0,040	0,0004	0,637	0,219	0,084		0,243
Desvio padrão (s)			0,051	0,0003	0,226	0,136	0,063		0,201

** : significativo a nível de 1% pelo teste do χ^2 .

* : significativo a nível de 5% pelo teste do χ^2 .

ns : não significativo

- : valores não estimados por falta de informação, devido ao alelo nulo da P₅

TABELA 9. Médias ($\bar{X}$), variâncias (s^2) e ($\bar{s}^2$), índice de fixação médio ($\bar{F}$), coeficiente de endogamia efetiva (F_e), heterozigosidade média ($\bar{h}$) observada e esperada com a significância pelo teste do (χ^2), das frequências alélicas de 15 locos enzimáticos polimórficos para 10 populações naturais de *S. humilis*, distribuídas no sentido Leste-Oeste, na região do Agreste do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Locos	Alelo	Frequência alélica média ($\bar{X}$)	Variância (s^2)	Variância média ¹ ($\bar{s}^2$)	Índice de fixação ² médio ($\bar{F}$)	Heterozigosidade ³ média ($\bar{h}$)			Coeficiente ⁴ de endogamia efetiva (F_e)
						esperada	observada	χ^2	
C ₂	R	0,178	0,008	0,0003	0,453	0,275	0,163	**	0,054
	L	0,822							
C ₃	R	0,302	0,039	0,0004	0,668	0,351	0,135	**	0,186
	L	0,698							
E ₁	R	0,855	0,022	0,0003	0,718	0,208	0,066	**	0,183
	L	0,145							
E ₂	R	0,877	0,007	0,0002	0,302	0,188	0,141	ns	0,072
	L	0,113							
L ₁	R	0,726	0,013	0,0004	0,497	0,375	0,200	**	0,061
	L	0,274							
L ₂	R	0,560	0,112	0,0005	0,797	0,290	0,098	**	0,454
	L	0,440							
M ₁	R	0,852	0,029	0,0003	0,683	0,198	0,080	**	0,227
	L	0,148							
M ₂	R	0,785	0,029	0,0004	0,556	0,276	0,146	**	0,169
	L	0,215							
P ₁	R	0,918	0,004	0,0002	0,336	0,143	0,095	ns	0,054
	L	0,082							
P ₂	R	0,652	0,072	0,0005	0,713	0,324	0,131	**	0,316
	L	0,348							
P ₄	R	0,109	0,016	0,0004	0,434	0,537	0,283	**	0,085
	I	0,378							
	L	0,513							
P ₅	R	0,551	0,008	0,0004	-	0,497	-		0,040
	L	0,027							
	N	0,422							
P ₆	R	0,037	0,009	0,0001	0,481	0,172	0,100	*	0,122
	I	0,892							
	L	0,071							
P ₇	R	0,143	0,020	0,0003	0,470	0,209	0,130	**	0,166
	L	0,857							
P ₈	R	0,343	0,054	0,0005	0,512	0,346	0,224	**	0,220
	L	0,657							
Média (15 locos)			0,029	0,0003	0,544	0,293	0,142		0,161
Desvio padrão (s)			0,030	0,0001	0,150	0,116	0,060		0,114

** : significativo a nível de 1% pelo teste do χ^2 .

* : significativo a nível de 5% pelo teste do χ^2 .

ns : não significativo.

- : valores não estimados por falta de informação, devido ao alelo nulo da P₅.

TABELA 10. Médias ($\bar{X}$), variâncias (s^2) e ($\bar{s}^2$), índice de fixação média ($\bar{F}$), coeficiente de endogamia efetiva (F_e), heterozigosidade média ($\bar{h}$) observada e esperada com a significância pelo teste do (χ^2), das frequências alélicas de 15 locos enzimáticos polimórficos para 10 populações naturais de *S. humilis*, distribuídas no sentido Leste-Oeste na região do Sertão do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Locos	Alelo	Frequência alélica média ($\bar{X}$)	Variância (s^2)	Variância média ¹ ($\bar{s}^2$)	Índice de fixação médio ($\bar{F}$)	Heterozigosidade média ($\bar{h}$)			χ^2	Coeficiente de endogamia efetiva (F_e)
						esperado	observado			
C ₂	R	0,134	0,010	0,0003	0,224	0,214	0,176	ns		0,088
	L	0,866								
C ₃	R	0,866	0,010	0,0002	0,311	0,324	0,162	**		0,284
	L	0,134								
E ₁	R	0,995	0,000	0,0000	1,005	0,009	0,005	ns		0,000
	L	0,005								
E ₂	R	0,852	0,004	0,0002	0,247	0,244	0,186	ns		0,031
	L	0,148								
L ₁	R	0,490	0,012	0,0004	0,520	0,477	0,244	**		0,048
	L	0,510								
L ₂	R	0,570	0,118	0,0004	0,796	0,276	0,100	**		0,481
	L	0,430								
M ₁	R	0,819	0,014	0,0002	0,797	0,269	0,058	**		0,095
	L	0,181								
M ₂	R	0,754	0,014	0,0003	0,676	0,344	0,125	**		0,075
	L	0,246								
P ₁	R	0,923	0,004	0,0001	0,578	0,134	0,055	**		0,054
	L	0,077								
P ₂	R	0,774	0,030	0,0003	0,743	0,296	0,089	**		0,169
	L	0,226								
P ₄	R	0,021	0,023	0,0003	0,453	0,463	0,268	**		0,086
	I	0,571								
	L	0,408								
P ₅	R	0,662	0,006	0,0003	-	0,465	-			0,036
	L	0,062								
	N	0,276								
P ₆	R	0,030	0,004	0,0001	0,219	0,122	0,103	ns		0,123
	I	0,929								
	L	0,041								
P ₇	R	0,183	0,013	0,0002	0,364	0,274	0,190	**		0,088
	L	0,817								
P ₈	R	0,315	0,037	0,0003	0,490	0,363	0,225	**		0,170
	L	0,685								
Média (15 locos)			0,020	0,0002	0,530	0,285	0,142			0,122
Desvio padrão (s)			0,029	0,0001	0,246	0,132	0,078			0,122

** : significativo a nível de 1% pelo teste do χ^2 .

* : significativo a nível de 5% pelo teste do χ^2 .

ns : não significativo

- : valores não estimados por falta de informação, devido ao alelo nulo da P₅.

duas regiões, parecem ser uma consequência de características típicas de populações isoladas e marginais. Se todos os locos analisados fossem seletivamente neutros, eles estimariam o mesmo F_e desde que a estimativa atingisse todos os genes do conjunto das populações. Em outras palavras, se em alguns ou em todos os locos a seleção estiver atuando, os vários F_e não poderiam ser estimados por um único F_e , porque poderia ser distorcido pela seleção.

A significância das diferenças entre a heterozigosidade média ($\bar{h}$) observada e esperada foi obtida pelo χ^2 . O alto número de locos com diferenças significativas, era esperada por se tratar de uma espécie não alógama, e os valores esperados foram calculados pressupondo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Locos com heterozigosidade não significativa (Tabelas 8, 9, 10) indicam uma proporção relativamente alta de heterozigotos ou uma alta taxa de cruzamento.

Tratando-se de um estudo da estrutura genética de populações, deve-se levar em consideração que a seleção natural pode atuar diferentemente para cada loco e cada alelo no loco e que o efeito da estrutura da reprodução uniformiza todos os locos e todos os alelos (LEWONTIN & KRAUER, 1973).

Na Tabela 11 são apresentadas estimativas da variabilidade gênica média em populações de plantas medidas com aloenzimas (retirada de GOTTLIEB, 1977), com a finalidade de comparar várias espécies de diferentes gêneros com a variação das populações de *S. humilis* estudadas. Nestas comparações onde se incluem espécies de autopolinização alta até autoincompatíveis, *S. humilis* apresenta uma proporção de locos polimórficos P e heterozigosidade média $\bar{H}$, relativamente altos enquanto o número médio de alelos A foi baixo.

TABELA 11. Variação isoenzimática em populações de plantas (retirado de GOTTLIEB, 1977)* comparados com os dados obtidos para *S. humilis*. Piracicaba, SP, 1987.

Espécies		Número de populações	Número de sistemas/ Número de locos	Proporção de locos polimórficos (P)	Número médio de alelos/ loco (A)	Heterozigosidade média (H)	Identidade genética (I)
<i>Avena barbata</i> "I"	a	9	3/5	0,00	-	0,00	1,00
<i>A. barbata</i> "II"	a	7	3/5	1,00	2,00	0,03	0,54
<i>Clarkia biloba</i>	b	3	7/8	0,62	3,60	0,15	0,42
<i>C. lingulata</i>	b	2	7/8	0,62	3,33	0,07	0,90
<i>C. rubiculata</i>	b	4	8/11	0,64	2,00	0,11	-
<i>Gaura longiflora</i>	e	3	10/18	0,33	3,16	0,07	0,99
<i>G. demareei</i>	e	2	10/18	0,28	3,00	0,05	0,99
<i>Hymenopappus scabrosaeus</i>	b	14	6/7	0,71	2,12	0,20	0,97
<i>H. artemisiaefolius</i>	b	12	6/7	0,71	2,05	0,21	0,94
<i>Lupinus subcarnosus</i>	b	8	7/8	0,88	1,84	0,10	0,97
<i>L. texensis</i>	b	10	7/8	0,88	3,12	0,36	0,96
<i>Lycopersicon cheesmanii</i>	a	54	4/14	0,57	2,65	0,01	-
<i>L. chmielewski</i>	b	8	4/14	0,50	3,52	-	-
<i>L. parviflorum</i>	a	8	4/14	0,14	2,00	0,00	-
<i>Lycopodium lucidulum</i>	a	16	11/18	0,28	1,39	0,07	0,98
<i>Genothera biennis</i>	a	106	11/20	0,30	1,40	0,10	0,95
<i>O. parviflora</i>	a	19	11/20	0,40	1,55	0,15	0,92
<i>O. strigosa</i>	a	29	11/20	0,25	1,30	0,03	0,97
<i>Phlox cuspidata</i>	a	10	11/16	0,38	2,33	0,01	0,95
<i>P. drummondii</i>	e	10	11/16	0,25	2,25	0,04	0,97
<i>Silene maritima</i>	b	2	13/21	0,29	2,33	0,14	-
<i>Stephanomeria exigua</i> subsp. <i>carotifera</i>	e	11	8/14	0,57	4,80	0,09	0,98
<i>S. exigua</i> subsp. <i>macrocarpa</i>	a	5	8/14	0,07	2,00	<0,01	0,99
<i>S. paniculata</i>	a	5	14/25	0,04	2,00	0,00	0,99
<i>Trapogon dubius</i>	a	6	13/21	0,24	2,50	<0,01	0,97
<i>T. porrifolius</i>	a	3	13/21	0,10	2,00	0,01	0,98
<i>T. pratensis</i>	a	3	13/21	0,00	-	0,00	1,00
<i>T. mirus</i>	a	6	13/21	0,24	1,20	-	-
<i>T. miscellus</i>	a	5	13/21	0,19	2,00	-	-
<i>Stylosanthes humilis</i>	b	25	5/20	0,62	1,66	0,19	0,92

a - autopolinização alta

b - autocompatível

e - autoincompatível

* - não são selecionados os pesquisadores dos trabalhos citados pelo autor.

Um outro nível de comparação foi realizado também com a variabilidade de algumas categorias da história vital e variáveis ecológicas (Tabela 12) (dados retirados de HAMRICK, 1979), com os dados obtidos para *S. humilis*. Esta espécie comparada com semelhantes no tipo de habitat, de sistema intermediário de cruzamento, anual de distribuição regional e dicotiledônea, mostrou uma proporção de locos polimórficos P superior em todas estas variáveis. Por outro lado, o número de alelos por loco A mostrou ser comparativamente inferior. Estes dados, juntamente com os da Tabela 11, possibilitam sugerir a existência de um tipo de variabilidade balanceada em que, o baixo número de mutações (alelos) por loco é compensado pela alta proporção de locos (dialélicos) polimórficos em *S. humilis*.

Nestas espécies (Tabela 12), observa-se que as plantas de espécies de distribuição regional e as autóegas e intermediárias, que são as categorias onde se situa o *S. humilis*, são as que possuem os maiores níveis de variação genética dentro de suas populações.

4.2. Divergência genética entre populações e regiões eco-geográficas

Nos últimos anos, uma considerável literatura foi acumulada relativa a divergência evolutiva a nível bioquímico, obtida pela determinação da divergência nas frequências gênicas usando dados de aloenzimas obtidos da eletroforese.

A distância genética segundo NEI (1972), estima o número de substituições gênicas acumuladas por loco entre populações. As substituições gênicas decorrem geral-

TABELA 12. Níveis de variabilidade entre algumas categorias da história vital e variáveis ecológicas (retirado de HAMRICK, 1979) comparados com os dados obtidos para *S. humilis*. Piracicaba, 1987.

Variáveis	Número de espécies analisadas	Número médio de locos	Locos polimórficos (P)		Número de alelos/locos (A)	
			$\bar{X}$	E.P.	$\bar{X}$	E.P.
1. Tipos taxonômicos						
Gimnosperma	11	9,2	67,01	7,99	2,12	0,20
Dicotiledônea*	74	11,4	31,28	3,31	1,46	0,06
Monocotiledônea	28	11,6	39,70	6,02	2,11	0,19
2. Distribuição geográfica						
Endêmica	17	15,1	23,52	5,06	1,43	0,11
Distrib.estreita	22	11,4	36,73	6,01	1,60	0,14
Distrib.regional*	39	8,3	55,96	5,13	1,85	0,10
Distrib.ampla	35	12,5	30,36	5,03	1,58	0,15
3. Comprimento de geração						
Anual*	42	11,2	39,47	4,32	1,72	0,11
Bianual	13	17,2	15,78	5,12	1,26	0,09
Perene de vida curta	31	12,0	28,09	5,06	1,46	0,09
Perene de vida longa	27	7,6	65,77	5,08	2,07	0,13
4. Sistema de cruzamento						
Autógama	33	14,2	17,92	3,21	1,27	0,06
Intermediária*	42	8,6	14,16	4,89	1,76	0,10
Alógama	36	11,3	51,07	4,95	1,85	0,12
5. Tipo de habitat						
Árido*	4	8,8	15,39	8,20	1,11	0,09
Semi-árido*	19	10,5	43,68	4,86	1,66	0,08
Úmido*	8	13,0	27,72	10,33	1,59	0,22
<i>Stylosanthes humilis</i>	-	15,0	62,25	2,04	1,66	0,02

* Variáveis onde se incluem as populações de *S. humilis* analisadas.

mente da seleção natural e na ausência desta a diferenciação só pode ocorrer devido a mutação ou a deriva genética.

Na Tabela 13 estão apresentadas a identidade I e a divergência D genéticas entre as 25 populações, duas a duas, obtidas pela metodologia de NEI (1972). A identidade que é o oposto da divergência genética representa o grau de similaridade genética entre duas populações quaisquer. A média de todas as medidas de identidade de uma população com todas as demais dá a identidade média $\bar{I}$ desta população. O mesmo se pode dizer com respeito à divergência genética média $\bar{D}$.

As diferenças encontradas entre populações podem estar distribuídas numa ampla escala de centenas de quilômetros ou em escala local de apenas alguns metros. Estas distâncias não fazem diferenças na magnitude das diferenças que podem ocorrer entre populações. Isto porque o padrão de diferenciação geralmente depende da seleção natural que se interpõe aumentando as diferenças, enquanto o fluxo gênico tende a diminuí-la. Como resultado, o padrão da diferenciação genética das populações tende a acompanhar o padrão ambiental. E, presumindo-se que estas diferenças são o produto da seleção natural, pressupõe-se que elas sejam adaptativas.

A variação entre populações, mostrada na Tabela 13, pode resultar de uma seleção local em diferentes direções, com migração mínima ou nula entre populações, levando à divergência, ou ainda ser resultado de deriva genética.

Não existe necessariamente a mesma explicação para todos os locos desde que a seleção certamente é dife-

Nota													Agreste					Sertão					I		
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	X	Y	Z	Pop.
A	-	0,96	0,92	0,92	0,92	0,90	0,89	0,86	0,87	0,86	0,84	0,82	0,85	0,82	0,86	0,86	0,85	0,84	0,84	0,88	0,91	0,49	0,92	0,91	0,88
B	0,04	-	0,95	0,91	0,93	0,92	0,87	0,89	0,85	0,85	0,83	0,78	0,83	0,80	0,83	0,84	0,83	0,83	0,84	0,84	0,88	0,85	0,90	0,88	0,90
C	0,08	0,04	-	0,91	0,93	0,89	0,84	0,87	0,84	0,83	0,79	0,77	0,82	0,78	0,82	0,81	0,83	0,81	0,83	0,85	0,91	0,88	0,91	0,86	0,86
D	0,06	0,09	0,10	0,98	0,92	0,92	0,92	0,91	0,87	0,88	0,86	0,87	0,87	0,86	0,85	0,89	0,90	0,91	0,88	0,88	0,93	0,93	0,95	0,97	0,90
E	0,08	0,08	0,11	-	0,94	0,93	0,94	0,90	0,90	0,87	0,88	0,88	0,89	0,87	0,87	0,92	0,92	0,89	0,89	0,89	0,94	0,94	0,96	0,96	0,92
F	0,10	0,08	0,07	0,06	-	0,94	0,94	0,93	0,96	0,93	0,91	0,88	0,90	0,85	0,89	0,91	0,91	0,89	0,90	0,90	0,94	0,92	0,94	0,92	0,91
G	0,12	0,14	0,17	0,08	0,08	0,07	0,95	0,94	0,94	0,93	0,95	0,95	0,96	0,94	0,95	0,98	0,97	0,97	0,95	0,92	0,96	0,95	0,97	0,96	0,94
H	0,14	0,11	0,14	0,10	0,06	0,05	-	0,93	0,95	0,94	0,93	0,93	0,95	0,94	0,94	0,96	0,95	0,94	0,94	0,88	0,96	0,95	0,96	0,94	0,93
I	0,14	0,16	0,14	0,11	0,07	0,06	0,07	0,98	0,91	0,94	0,94	0,94	0,94	0,91	0,94	0,94	0,93	0,93	0,94	0,95	0,99	0,94	0,95	0,91	0,92
J	0,15	0,16	0,19	0,13	0,11	0,04	0,05	0,02	0,92	0,95	0,94	0,94	0,94	0,89	0,92	0,93	0,92	0,92	0,93	0,91	0,96	0,94	0,96	0,91	0,92
K	0,17	0,19	0,29	0,15	0,14	0,06	0,06	0,09	0,09	0,09	0,97	0,96	0,98	0,98	0,98	0,94	0,92	0,97	0,96	0,94	0,92	0,91	0,90	0,92	
L	0,19	0,24	0,34	0,14	0,12	0,09	0,05	0,07	0,06	0,05	0,93	-	0,99	0,98	0,97	0,98	0,96	0,95	0,97	0,95	0,95	0,94	0,92	0,93	
M	0,20	0,24	0,26	0,13	0,12	0,11	0,05	0,07	0,07	0,07	0,04	0,01	0,98	0,97	0,98	0,96	0,95	0,96	0,95	0,93	0,94	0,94	0,93	0,92	
N	0,16	0,19	0,19	0,12	0,11	0,04	0,05	0,06	0,07	0,03	0,01	0,02	-	0,99	0,99	0,97	0,96	0,99	0,99	0,95	0,97	0,94	0,94	0,92	
O	0,20	0,23	0,25	0,16	0,14	0,07	0,06	0,10	0,11	0,02	0,03	0,03	0,01	-	0,99	0,97	0,95	0,97	0,97	0,92	0,94	0,91	0,91	0,92	
P	0,15	0,19	0,11	0,11	0,12	0,04	0,06	0,06	0,08	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,98	0,97	0,96	0,93	0,93	0,95	0,94	0,94	0,94	0,94	
Q	0,15	0,17	0,21	0,10	0,08	0,09	0,02	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02	-	0,98	0,99	0,99	0,92	0,96	0,95	0,96	0,94	
R	0,16	0,16	0,19	0,10	0,08	0,09	0,03	0,05	0,07	0,08	0,07	0,05	0,04	0,05	0,03	0,02	0,98	0,97	0,97	0,93	0,95	0,93	0,95	0,93	
S	0,17	0,18	0,21	0,12	0,11	0,11	0,03	0,06	0,07	0,08	0,04	0,04	0,01	0,03	0,04	0,01	0,02	-	0,89	0,96	0,95	0,92	0,93	0,92	
T	0,17	0,18	0,18	0,13	0,11	0,11	0,05	0,06	0,06	0,08	0,04	0,05	0,04	0,05	0,08	0,05	0,08	0,07	0,04	0,04	0,96	0,91	0,93	0,90	
U	0,13	0,18	0,16	0,12	0,12	0,11	0,08	0,13	0,05	0,09	0,06	0,05	0,07	0,05	0,08	0,05	0,08	0,07	0,05	0,05	0,03	0,93	0,90	0,92	
V	0,09	0,12	0,09	0,07	0,06	0,06	0,04	0,04	0,05	0,04	0,06	0,05	0,06	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	-	0,97	0,98	0,95	
X	0,12	0,16	0,13	0,07	0,06	0,08	0,05	0,06	0,06	0,09	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,07	0,08	0,08	0,09	0,03	0,99	0,97	0,93	
Y	0,08	0,11	0,10	0,05	0,04	0,06	0,03	0,04	0,05	0,04	0,09	0,06	0,07	0,06	0,09	0,04	0,05	0,07	0,07	0,07	0,02	0,01	0,98	0,94	
Z	0,09	0,12	0,10	0,02	0,04	0,08	0,04	0,06	0,10	0,09	0,10	0,08	0,07	0,09	0,06	0,04	0,05	0,08	0,08	0,10	0,04	0,03	0,02	-	0,93
B	0,13	0,15	0,16	0,10	0,09	0,09	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,05	0,06	0,09	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,08	0,05	0,07	0,06	0,07	0,92
Pop.																									0,08

rente para funções diferentes.

A divergência máxima entre duas populações num loco, ocorre quando não há nenhum alelo em comum. E o mínimo de divergência num loco existe quando as duas populações têm alelos similares em igual frequência. Como as populações de *S. humilis* que estão sendo analisadas são da mesma espécie, devem ser extremamente semelhantes geneticamente. Para testar a significância das distâncias genéticas (D) entre as populações foi realizado o teste do χ^2 (Tabela 14). Este teste elaborado por NEI & ROYCHOUDHURY (1974), para determinar a significância das distâncias genéticas entre taxons, mostrou ser não significativas as distâncias entre as 25 populações da espécie em estudo. Valores significativos do χ^2 , representariam um processo adiantado de formação de novas espécies ou subespécies, o que não é o caso destas populações de *S. humilis*.

A distância genética mínima (D_m) testada (Tabela 14), permite ver que é no Agreste onde se encontra a população com maior distância mínima média ($\bar{D}_m$) (população 0) e a de menor distância mínima média (população J). Além disso a Mata comporta a maior média de distância genética mínima entre regiões, enquanto o Agreste possui a menor média.

As diferenças nas distâncias genéticas entre populações pode ter se originado em resposta a diferenças ecológicas e/ou como resultado da migração (facilitada em populações de beira de rodovia), entre populações de composição genética diferente. Num trabalho com *T. pisana* utilizando 7 sistemas enzimáticos polimórficos em 10 regiões climáticas, NEVO & BAR (1976), observaram associação da heterogeneidade genética com a variação de umidade e/ou temperatura e distâncias geográficas. Mesmo podendo influir, a dis-

TABELA 1A. Valores de distância genética mínima (D_m) entre 25 populações de S. humilis do Estado de Pernambuco, determinados pelo método de NEI & ROYCHOUDHURY (1974), e suas significâncias. Piracicaba, SP, 1987.

Mata													Agreste													Sertão													Média
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	X	Y	Z															
A	-	1,385	1,430	1,353	1,373	1,237	1,213	1,248	1,220	1,185	1,223	1,210	1,245	1,260	1,270	1,230	1,210	1,228	1,242	1,262	1,262	1,265	1,300	1,276	1,307	1,310													
B	-	-	1,457	1,336	1,367	1,241	1,195	1,264	1,277	1,174	1,208	1,177	1,213	1,233	1,248	1,203	1,193	1,221	1,225	1,254	1,224	1,236	1,262	1,250	1,276	1,255													
C	-	-	-	1,408	1,456	1,290	1,238	1,313	1,257	1,219	1,274	1,239	2,264	1,298	1,299	1,264	1,233	1,270	1,273	1,316	1,304	1,303	1,442	1,304	1,341	1,312													
D	-	-	-	-	1,423	1,246	1,230	1,275	1,219	1,190	1,232	1,242	1,286	1,280	1,294	1,250	1,235	1,268	1,266	1,285	1,264	1,272	1,330	1,296	1,358	1,285													
E	-	-	-	-	-	1,275	1,244	1,318	1,256	1,221	1,256	1,266	1,309	1,304	1,326	1,272	1,266	1,297	1,292	1,315	1,282	1,384	1,360	1,324	1,365	1,311													
F	-	-	-	-	-	-	1,147	1,204	1,166	1,154	1,161	1,175	1,197	1,193	1,199	1,154	1,150	1,177	1,178	1,202	1,176	1,183	1,218	1,191	1,208	1,197													
G	-	-	-	-	-	-	-	1,200	1,160	1,132	1,191	1,193	1,234	1,226	1,249	1,192	1,181	1,204	1,223	1,230	1,182	1,230	1,194	1,225	1,204														
H	-	-	-	-	-	-	-	-	1,209	1,186	1,242	1,231	1,274	1,276	1,309	1,233	1,223	1,241	1,251	1,275	1,204	1,238	1,284	1,243	1,267	1,250													
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,183	1,191	1,209	1,248	1,240	1,252	1,202	1,178	1,201	1,218	1,250	1,226	1,230	1,249	1,209	1,211	1,219													
J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,162	1,181	1,214	1,200	1,209	1,158	1,144	1,165	1,180	1,203	1,165	1,176	1,216	1,179	1,184	1,182													
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,258	1,297	1,298	1,337	1,258	1,208	1,228	1,273	1,287	1,242	1,222	1,254	1,204	1,233	1,239													
L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,320	1,298	1,328	1,255	1,216	1,238	1,272	1,282	1,251	1,227	1,279	1,220	1,247	1,242													
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,344	1,378	1,299	1,265	1,282	1,314	1,323	1,282	1,265	1,318	1,260	1,298	1,296													
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,377	1,300	1,257	1,277	1,316	1,342	1,285	1,279	1,307	1,252	1,284	1,280													
O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,339	1,293	1,312	1,348	1,368	1,297	1,285	1,322	1,268	1,306	1,333													
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,225	1,246	1,258	1,299	1,247	1,231	1,266	1,218	1,257	1,244													
Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,235	1,255	1,278	1,198	1,202	1,247	1,208	1,246	1,244													
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,276	1,298	1,236	1,225	1,265	1,228	1,264	1,245													
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,328	1,272	1,245	1,276	1,235	1,265	1,262													
T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,296	1,276	1,293	1,253	1,284	1,283													
U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,243	1,263	1,218	1,241	1,244													
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,281	1,238	1,260	1,244													
X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,304	1,324	1,245													
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,283	1,244													
Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,272													
Média/Região																											1,295												
Média/Região																											1,244												
Média/Região																											1,253												

ns : não significativo pelo teste do χ^2 em todas as populações.

m.s.

tância geográfica, que pode facilitar o fluxo gênico, em si, não é um componente importante a todas as espécies. A seleção natural sim, pode atuar tanto para manter como para eliminar novos alelos. Assim, por exemplo, a irregularidade espacial na intensidade de seleção pode ser devido a variação local.

O padrão de diferenciação genética entre populações de plantas parcial ou completamente isoladas tem sido um dos principais tópicos de interesse da genética ecológica.

Analizando a divergência média ($\bar{D}$) de cada população (Tabela 15), que é ilustrada na Figura 22, observa-se um gradiente que se inicia com as menores divergências médias nas populações do Sertão e vai aumentando numa linha média ascendente até as populações A, B, C da praia. As populações que mais se afastam desta linha média são as populações U, X, Z do Sertão e G, N, O do Agreste. Nas do Agreste, as diferenças podem ter sido causadas pela heterogeneidade ambiental e nas do Sertão, além do ambiente, pelo isolamento das populações afastadas das rodovias.

A linha média das regiões da Figura 22, mostra um desnível muito pequeno entre o Agreste e o Sertão e bastante acentuado entre a Mata e o Agreste. A observação de uma baixa variabilidade genética (P, A, H) nas populações isoladas da Mata e a ampla divergência (distância) genética destas populações, parece estar de acordo com a hipótese isoalélica de deriva genética (efeito do fundador), devido a recente colonização por um pequeno número de indivíduos. É precisamente nestas populações, sem troca de genes com as demais populações da espécie de outras regiões, que a homozigosidade cresceu e os alelos sofreram mudanças ao acaso sem relação ne-

nhuma com as demais populações. É o que parece ilustrar as Figuras 4 a 18 (pag. 69 a 83) e as variâncias relativamente altas das frequências gênicas dos locos da Mata (Tabela 10, pag.100).

TABELA 15. Distância genética média ($\bar{D}$) total de cada região baseada nas divergências genéticas entre 25 populações de *S. humilis*; distância genética média ($\bar{D}'$) dentro de cada região; diferença (d) e porcentagem entre as distâncias genéticas médias totais e locais de cada região ecogeográfica do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Distância média			Mata	Agreste	Sertão
Desvio padrão					
$\bar{D}$	$\pm$	s	$0,126 \pm 0,13$	$0,077 \pm 0,05$	$0,066 \pm 0,05$
$\bar{D}'$	$\pm$	s	$0,068 \pm 0,02$	$0,060 \pm 0,03$	$0,046 \pm 0,02$
Amplitude			0,02-0,10	0,01-0,16	0,01-0,10
d(%)			0,058 (46,0%)	0,017 (22,1%)	0,020 (30,3%)

Populações com divergências genéticas distantes em relação as demais, como se observa nas da Mata, podem refletir eventos históricos associados com a migração do homem e animais no passado. Estes eventos podem ter introduzido os fundadores para as novas populações. Esta hipótese já levantada por GURIES & LEDIG (1982), num estudo com *Pinus rigida*, tem respaldo histórico no caso de *S. humilis* em Pernambuco, onde só foram localizadas populações na Mata em áreas ocupadas por pescadores que ainda hoje cultivam o hábito de manter pequenas criações caseiras de caprinos, que tem origem no Sertão, de onde grande parte emigrou. Além

FIGURA 22. Distâncias genética média ($\bar{D}$) entre 25 populações de *S. humilis*, e a linha média ($\bar{X}$), das regiões distribuídas nos dois sentidos (Norte-Sul, Leste-Oeste), ao longo de 3 regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

disso, sabe-se que a estrutura da semente de *S. humilis*, é provida de um gancho característico que favorece sua dispersão através do pelo do animal.

Na Tabela 15 estão apresentadas a distância genética média $\bar{D}$ total de cada região entre as 25 populações, a distância genética média dentro de cada região $\bar{D}'$, a diferença (d) entre a distância genética total e a regional, e a amplitude das divergências dentro de cada região. Com estes dados é possível saber a porcentagem da distância genética que é devido a diferenças genéticas entre as populações de outras regiões e a que é devida as diferenças dentro da região.

As diferenças (d), desta Tabela 15, mostram que apenas 22,1% das divergências do Agreste são diferenças entre regiões e 77,9% de suas distâncias ocorrem pela variação dentro desta região. No Sertão 30,3% de suas divergências são com as outras regiões e 69,7% pela própria variação dentro da região. Ao considerar os dados de divergência (Tabela 13, pag. 106), observa-se que as populações afastadas da rodovia, são as principais responsáveis por esta variação na distância dentro do Sertão. Na Mata, 46,0% de suas divergências são devido as diferenças com outras regiões e 54% dentro da região da Mata.

Estes resultados possibilitam confirmar a grande variabilidade genética do Agreste, o isolamento genético das populações da Mata, em que praticamente a metade de suas divergências gênicas, são diferenças relativas, às outras regiões. Totalizando, 67,2% das diferenças gênicas (distâncias genéticas) são devido à variação entre populações dentro de regiões e 32,8% entre regiões. O desvio padrão e amplitude dos dados de cada região, dão de modo sin-

tético o tipo de distribuição destes dados, os quais reforçam a interpretação dada.

Sem uma documentação adequada das condições e mudanças ambientais no espaço e tempo, é difícil separar populações que sejam ecologicamente marginais das que são apenas periféricas geograficamente. Num estudo de populações de *Hordeum jubatum* (SCHUMAKER & BABEL, 1980), concluíram que as populações centrais eram mais variáveis do que as marginais. Isto parece estar acontecendo entre as populações da Mata como marginais em relação as do Agreste e Sertão como centrais. As populações da Mata exibem uma variabilidade reduzida, porém devido a uma seleção mais intensa em ambientes marginais (efeito gargado de garrafa), e/ou devido ao princípio do fundador, observa-se a deriva genética e uma maior autogamia nestas populações (ver item 4.3.). Os resultados obtidos nas populações de *S. humilis* mostraram o mesmo princípio observado em *Drosophila pseudoobscura* por PRAKASH et alii (1969), em que, enquanto as populações centrais eram variáveis, obtiveram uma população isolada que apresentou maior divergência genética quando comparada com as demais populações.

A história evolutiva de cada espécie parece ter uma importante função dentro da estrutura populacional. Assim, enquanto o *S. humilis* de clima seco, possui seu centro de diversidade em região seca, CLEGG & ALLARD (1972), trabalhando com *Avena barbata*, observaram que as populações de regiões, semi-áridas da Califórnia eram monomórficas e as de regiões úmidas eram extensivamente polimórficas. Por outro lado, observaram também um monomorfismo genético em habitats úmidos e secos extremos, e nos habitats intermediários um máximo de polimorfismo, como foi encontrado no Agreste em *S. humilis*, que é uma região de clima intermediário.

As populações centrais tendem a apresentar também, como se observou na coleta em regiões do Sertão e Agreste, uma maior densidade populacional, além da variabilidade genética, devido a existência de uma seleção natural mais frouxa e um maior número de nichos diferentes disponíveis. Ao passo que, as populações marginais tendem a possuir menor densidade populacional, além de menor variabilidade, uma vez que poucos genótipos permitem a adaptação às condições mais rigorosas do ambiente.

Dois pontos são importantes para definir populações marginais: primeiro, que nem todas as populações marginais estão localizadas perifericamente, uma vez que a topografia e as condições ecológicas podem impor condições marginais no centro geográfico da distribuição, e, segundo, que nem todas as populações geograficamente periféricas são marginais. Assim, se observarmos os dados de variabilidade discutidos no item 4.1. e os de divergência genética (Tabelas 13, 14, 15 (pags. 106, 108 , 110), constata-se que a população 0, do Agreste, próximo a transição com o Sertão, tem todas as características de uma população marginal em pleno centro geográfico da espécie abrangida por este estudo. As condições de população marginal no que tange a variabilidade desta população 0 é ilustrada pela localização dentro do bloco das populações da Mata nas Figuras 20 e 21 (pags. 94, 95) do item 4.1.

O grau de marginalidade de uma população, bem como sua divergência em relação as populações centrais depende também da amplitude ecológica da espécie, a qual é afetada por sua habilidade em adaptar as populações a diferentes ambientes.

O índice de similaridade médio de todas as 25

populações estudadas foi de 0,92, o qual comparado com o de outras espécies (Tabela 11, pag. 102) é considerado baixo, o que mostra haver uma divergência genética relativamente alta em relação as demais.

4.3. Determinação da taxa de cruzamento e seus efeitos sobre a estrutura populacional

O sistema reprodutivo está entre os mais importantes determinantes da estrutura da população porque é ele que determina o padrão pelo qual os gametas são distribuídos, e conseqüentemente exerce o controle primário na distribuição das frequências genotípicas.

Hoje, segundo JAIN (1975), é incontestavelmente reconhecido que a estimativa dos parâmetros do sistema de cruzamento é crucial para entender a evolução de plantas.

As espécies do gênero *Stylosanthes* são consideradas geralmente autógamas. Entretanto, publicações esporádicas relatando a ocorrência de híbridos interespecíficos, mostram haver um certo nível de cruzamentos em algumas espécies. Assim, por exemplo, STACE (1982), trabalhando com introduções de *S. scabra*, nas condições da Austrália, obteve uma taxa de cruzamento de 1,3% a 2,9%. MILES (1985), estudando *S. guianensis*, determinou a taxa de cruzamento utilizando marcadores morfológicos, em condições controladas obtendo uma taxa de 13,8%.

4.3.1. Taxa de cruzamento em populações naturais presumindo equilíbrio endogâmico

A Tabela 16 apresenta a taxa de cruzamento

TABELA 16. Taxa de cruzamento ($\bar{t}$), desvio padrão (s) e teste do (χ^2), entre locos de *S. humilis* de 14 populações representativas das 3 regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco, utilizando o índice de fixação de Wright (F) de 5 locos isoenzimáticos (NEI & SYAKUDO, 1958). P1-racicaba, SP, 1987.

Populações	$\bar{F}$										χ^2				
	C ₃	L ₁	M ₁	P ₂	P ₈	$\bar{X}$	$\pm$	s	L ₁	M ₁	P ₂	P ₄	$\bar{X}$	$\pm$	s
A	0,40	0,92	-	-	0,81	0,71	$\pm$ 0,27		0,43	0,04	-	0,10	0,19	$\pm$ 0,21	2,397ns
C	0,71	0,61	0,50	0,53	0,83	0,64	$\pm$ 0,14		0,17	0,24	0,33	0,31	0,23	$\pm$ 0,10	2,667ns
E	0,53	0,88	0,68	0,14	0,55	0,56	$\pm$ 0,27		0,31	0,06	0,19	0,75	0,32	$\pm$ 0,26	5,903ns
Mata:Média								0,64							0,25
I	0,78	0,66	0,28	0,75	0,88	0,67	$\pm$ 0,23		0,12	0,32	0,56	0,14	0,24	$\pm$ 0,20	7,369ns
J	0,62	0,36	0,49	0,46	0,44	0,47	$\pm$ 0,09		0,23	0,47	0,34	0,37	0,36	$\pm$ 0,09	1,258ns
K	0,60	0,47	1,00	0,26	0,44	0,55	$\pm$ 0,28		0,25	0,36	0,00	0,59	0,32	$\pm$ 0,22	1,912ns
L	0,82	0,62	0,78	0,54	0,46	0,64	$\pm$ 0,15		0,10	0,23	0,12	0,30	0,22	$\pm$ 0,12	2,111ns
N	0,44	0,38	1,00	0,38	0,22	0,48	$\pm$ 0,30		0,39	0,45	0,00	0,45	0,39	$\pm$ 0,24	0,706ns
Agreste:Média								0,56							0,31
P	0,30	0,19	0,09	0,29	0,09	0,19	$\pm$ 0,10		0,54	0,68	0,83	0,55	0,69	$\pm$ 0,14	1,516ns
Q	0,38	0,33	0,78	0,77	0,48	0,55	$\pm$ 0,21		0,45	0,50	0,12	0,13	0,31	$\pm$ 0,18	11,144**
R	0,15	0,48	0,63	0,72	0,36	0,47	$\pm$ 0,22		0,74	0,35	0,23	0,16	0,39	$\pm$ 0,23	6,695ns
T	0,92	0,50	0,02	0,62	0,84	0,58	$\pm$ 0,36		0,04	0,33	1,04	0,23	0,35	$\pm$ 0,40	6,379ns
V	0,70	0,56	0,72	0,62	0,25	0,57	$\pm$ 0,19		0,18	0,28	0,16	0,23	0,29	$\pm$ 0,18	4,454ns
Y	0,47	0,59	0,80	0,83	0,57	0,65	$\pm$ 0,16		0,36	0,26	0,11	0,09	0,22	$\pm$ 0,11	4,529ns
Sertão:Média								0,50							0,38

** : significativo ao nível de 1% pelo teste de χ^2 .

ns : não significativo.

obtida utilizando 5 locos isoenzimáticos dialélicos e polimórficos, de 14 populações contendo um número efetivo de indivíduos condizentes com o modelo proposto por NEI & SYAKUDO (1958). As taxas de cruzamento destas 14 populações, sendo 3 da Mata, 5 do Agreste e 6 do Sertão, foram calculadas através do índice de fixação ($\bar{F}$), expresso por loco em cada população. A média ($\bar{X}$) das taxas de cruzamento (t) dos locos examinados de cada população deu o ($\bar{t}$) das populações. Através do desvio padrão (s) da taxa média de cruzamento, é possível verificar a grande variação dos valores de $\bar{t}$ de cada loco. As diferenças entre locos são compreensíveis tendo em vista que cada loco é independente, possui frequência alélica diferente na população materna, e a frequência de cada gene no pólen efetivamente presente para fertilizar as plantas amostradas também é diferente.

A significância das diferenças entre as taxas de cruzamento dos locos de cada população foi testada pelo χ^2 elaborado por JAIN (1979). O resultado foi de que apenas a população Q teve diferenças significativas, para as demais, as diferenças de $\bar{t}$ entre locos foram não significativas. As diferenças de $\bar{t}$ entre os locos desta população Q, deve ter como causa uma substancial variação intrapopulacional na frequência da taxa de cruzamento ou a existência de diferenças na frequência alélica efetiva do pólen entre plantas. Um simples isolamento espacial da planta ou de uma pequena colônia de plantas em relação ao centro da população, já pode causar uma diminuição sensível da frequência de pólen para sua fertilização. Portanto, a causa básica destas diferenças, é a estrutura populacional, principalmente o tamanho e a distribuição local.

Mesmo sabendo que a taxa de cruzamento obtida por esta metodologia, não é das mais precisas, por presumir

a existência de um equilíbrio endogâmico na população, parece não haver grandes disparidades em seus resultados. Isto tanto pode ser constatado pela não significância de $\hat{f}$ entre os locos de quase todas as populações, como pelo resultado similar obtido utilizando metodologias mais precisas.

4.3.2. Taxa de cruzamento em populações naturais obtida através da segregação mendeliana quantificada nas progênes dos genótipos maternos

Na Tabela 17 estão os resultados da taxa de cruzamento ($\hat{f}$) e da frequência gênica efetiva (p') do pólen, de três populações naturais B, H e Q, obtida através de dois genes marcadores (E_1 e E_2). A população B foi escolhida para representar a Mata, H o Agreste e Q o Sertão. Para determinar a taxa de cruzamento destas populações naturais utilizou-se uma metodologia apropriada, desenvolvida por BROWN & ALLARD (1970), BROWN et alii (1975), pelo uso de genes marcadores aloenzimáticos. Estas estimativas, mesmo com as pressuposições mínimas exigidas de que a taxa de cruzamento seja constante em todos genótipos maternos da população e a dispersão do pólen seja ao acaso, são as mais precisas e adequadas para se obter a taxa de cruzamento em populações naturais.

Os valores de (p') (Tabela 17), fazem sentido, porque existem condições em que não se observa a dispersão casual do pólen paterno sobre o genótipo materno. Isto acontece principalmente quando a população é subdividida em subpopulações, diferindo em frequência genotípica entre as quais existe um fluxo de pólen muito limitado. Em *S. humilis* é bastante comum a formação de pequenas colônias isoladas, formadas por sucessivas coortes de uma ou poucas famílias endogâmicas.

TABELA 17. Taxa de cruzamento ($\bar{f}$) e frequência alélica do pólen (p') de 3 populações naturais de *S. humilis* representantes das 3 regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco, através da análise dos locos E_1 e E_2 da progênie de famílias previamente determinadas (BROWN, 1975). Piracicaba, SP, 1987.

Pop.	Região	Famílias		Progenie		Frequência alélica do pólen	Taxa de cruzam.		χ^2
		N	Genó- tipo	Genó- tipo	N		$p' \pm s$	$\bar{f} \pm s$	
B	Mata	15	E_1 -RR	RR	40	$0,50 \pm 0,21$	$0,10 \pm 0,04$		
				RL	2				
			E_1 -LL	LL	60				
				RL	3				
			E_2 -RR	RR	130	$0,55 \pm 0,35$	$0,18 \pm 0,15$	$0,14 \pm 0,10$	ns
				RL	12				
			E_2 -RL	RR	25				
				LL	24				
Média Total		15			296				
H	Agreste	20	E_1 -RR	RR	90	$0,32 \pm 0,10$	$0,22 \pm 0,04$		
				RL	16				
			E_1 -LL	LL	78				
				RL	7				
			E_2 -RR	RR	157	$0,59 \pm 0,27$	$0,22 \pm 0,15$	$0,22 \pm 0,10$	ns
				RL	16				
			E_2 -RL	RR	25				
				LL	23				
Média Total		20			412				
Q	Sertão	12	E_2 -RR	RR	165	$0,56 \pm 0,18$	$0,34 \pm 0,14$	$0,34 \pm 0,14$	ns
				RL	30				
			E_2 -RL	RR	26				
				LL	24				
Média Total		12			245				
Média geral							$0,23 \pm 0,11$		
Total geral		47			953				

ns : diferenças não significativas entre locos da mesma população, pelo teste χ^2 (JAIN, 1979).

Para este estudo, foram analisadas 47 famílias, sendo 15 da população B, 20 da H e 12 da O. E, para cada família destas, foram analisadas em média 20 progênies, totalizando 953 genótipos. Diferentes locos marcadores podem dar diferentes taxas de cruzamento para a mesma população, pelos motivos expostos acima. E, diferenças na taxa de cruzamento entre genótipos maternos podem refletir diferenças na taxa de cruzamento entre as duas populações parentais (de genótipos), como também pode haver produção diferencial de pólen pelos dois genótipos, ou seleção diferencial do pólen dos genótipos. Este problema argumenta a favor do uso de mais de um loco marcador. O uso de mais de um loco foi considerado pelo lado prático da técnica. Como o espaço, material e tempo, dispendido para cada gel de eletroforese são essenciais a questão relevante foi como obter mais de um loco com bom polimorfismo num único sistema. Assim sendo, não seria prático usar locos de diferentes sistemas, onde para isto seria necessário repetir a análise do mesmo material, quando num único sistema enzimático, se pode ter vários locos num só zimograma.

Foi por este motivo que foram escolhidos os locos marcadores (E_1 e E_2), nos quais além de se ter os resultados de dois locos para o mesmo material e mesmo gel, o material foi usado, na fase de semente recém embebida, o que também veio facilitar a análise.

O uso de mais de um loco (multi-loco), é estatisticamente mais eficiente do que um apenas, porque fornece mais informações da distribuição espacial. Entretanto, a escolha das famílias a serem analisadas obedecem critérios que esgotaram as possibilidades de aumento da amostragem de famílias e locos, utilizando estes mesmos marcadores para todas as famílias.

As diferenças não significativas testadas pelo χ^2 , entre os dois locos das populações B e H, mostram a distribuição homogênea das plantas amostradas de cada população, bem como a frequência e a distribuição dos alelos destes locos marcadores.

Comparando-se as frequências alélicas efetivas (p') dos locos marcadores de cada população analisada (Tabela 17), com as frequências dos mesmos alelos e mesmas populações (Tabela 2, pag. 63), sendo entretanto da geração materna, observa-se que não são iguais. Enquanto a frequência dos alelos R do conjunto de pólen dos locos E_1 e E_2 da população B são 0,50 e 0,55, respectivamente, na geração materna foi 0,37 e 0,84; enquanto na população H, os alelos do pólen dos dois locos possuem as frequências 0,32 e 0,59, as frequências da geração materna foi 0,67 e 0,87; e na população Q, o alelo R do loco E_2 do pólen possui a frequência 0,56 enquanto na geração materna foi 0,74.

Estas diferenças se justificam primeiramente porque as frequências alélicas do pólen estimadas correspondem a presença efetiva destes alelos na fertilização das plantas amostradas da população (que não são todas as amostras usadas na análise da geração materna). E em segundo lugar, as estimativas das frequências alélicas do pólen correspondem a uma outra geração, sujeita a todas as oscilações causadas pelas diferenças ambientais de tempo. O que confirma CLEGG (1980) ao afirmar que o modelo de cruzamento intermediário em populações de plantas mostrou que o nível de autofertilização atingida por uma população está sob controle genético mas provavelmente é sujeito a significantes influências ambientais. ALLARD et alii (1975) afirmaram ser a taxa de cruzamento altamente flexível e capaz de uma rápida mudança, no tempo e no espaço.

4.3.3. Taxa de cruzamento num ensaio de campo obtida através de progênie de genótipos homozigotos

Uma terceira estimativa da taxa de cruzamento em *S. humilis*, foi feita num ensaio de campo controlado em Anhembi, Piracicaba. Este ensaio foi feito num bloco isolado, de plantas com genótipos marcadores conhecidos (E_1) equidistantes. A Tabela 18 apresenta a taxa de cruzamento obtida deste ensaio que teve 14 famílias sobreviventes, 8 com genótipo RR e 6 com LL, das quais foram analisadas 364 progênies. A geração dos progenitores (P_1), foi formada por duas famílias, uma de genótipo RR da população C da Mata e outra de genótipo LL da população U do Sertão. A taxa de cruzamento médio dos dois genótipos foi 0,21 (21%).

TABELA 18. Taxa de cruzamento observada ($\bar{t}$) através de gene marcador (E_1) entre famílias homozigotas com distribuição alternada e equidistante (1,0 m) em bloco isolado (JAIN, 1979). Piracicaba, SP, 1987.

Famílias (P_1)	Genótipo materno	Progênie (F_1)					$\bar{t}$	$\pm$	s
		RR	LL	RL	N	Freq. alélica			
8	RR	191		17	208	0,58	0,19	$\pm 0,03$	
6	LL		135	21	156	0,42	0,23	$\pm 0,07$	
Total 14		191	135	38	364				
Média							0,21		

Entretanto, uma constatação interessante, está ilustrada na Figura 23. Aqui observa-se que a taxa de cruzamento não teve uma distribuição uniforme durante o pe-

FIGURA 23. Curva determinada pela porcentagem de cruzamentos observados durante o período de floração do ensaio de bloco isolado para determinar a taxa de cruzamento através de gene marcador (E_1) em *S. humilis*. Piracicaba, SP, 1987.

riodo de floração, pois sua frequência foi proporcional a quantidade de plantas florescidas. A porcentagem de cruzamento (heterozigotos) obtida nas primeiras e últimas plantas floradas foi relativamente baixa ou nula, enquanto que as plantas cuja floração ocorreu no período central de florescimento tiveram as porcentagens mais altas de cruzamentos.

Este resultado leva a crer que o fator polinizador formado principalmente por pequenos insetos (MILES, 1987)¹, deve ter uma função preponderante, juntamente com outros agentes. Aliás, as observações em campo mostraram que o período de fertilização externa normalmente é curto, pois a flor desta espécie fica fechada durante a noite, durante a chuva e no período de sol intenso. Apenas fica aberta, apta para receber pólen de fora durante um curto período do dia que inicia com os primeiros raios solares sobre a planta e perdura durante um período médio de duas horas, variando este período com a intensidade do sol. O tempo de abertura da flor pode ser mais um fator genético de influência ambiental que regula a taxa de cruzamento de *S. humilis* nas diferentes populações.

A taxa de cruzamento entre as populações analisadas através das três metodologias cujos resultados acabam de ser tratados, realmente mostra variação, principalmente entre as populações do Agreste como está ilustrado na Figura 24. Esta figura ilustra as Tabelas 16 e 17, que juntamente com a Tabela 19 oferece uma estimativa da taxa de cruzamento da espécie *S. humilis*. Estas são as primeiras estimativas, que se tem conhecimento, da determinação da ta-

¹ MILES, J.W. (CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical). Comunicação pessoal, 1987.

FIGURA 24. Distribuição da taxa de cruzamento (t) em 16 populações (A, C, E, I, J, K, L, N, P, R, T, V, Y: Metodologia de NEI & SYAKUDO, 1958; B, H, Q: Metodologia de BROWN, 1975), de *S. humilis* ao longo das 3 regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

xa de cruzamento nesta espécie. Por isto mesmo foram usadas três metodologias diferentes, desde a mais tradicional do ensaio controlado até, reconhecidamente a mais eficiente que possibilitou determinar a taxa de cruzamento em populações naturais, sem alteração nenhuma de seu ambiente ecológico natural.

TABELA 19. Taxa de cruzamento médio ($\bar{t}$) e erro padrão (EP) de populações de *S. humilis* do Estado de Pernambuco, obtida em diferentes locais e metodologias. Piracicaba, SP, 1987.

Locais	Calculado a partir de ($\bar{F}$) (NEI & SYAKUDO, 1958)		Calculado a partir da metodologia de BROWN (1975)		Calculado a partir de ensaio com gene marcador (JAIN, 1979)	
	$\bar{t}$	EP	$\bar{t}$	EP	$\bar{t}$	EP
R.Mata	0,25	0,04	0,14	0,04		
R.Agreste	0,31	0,06	0,22	0,00		
R.Sertão	0,38	0,06	0,34	0,04		
Ensaio-Anhembí					0,21	0,02
Média	0,32		0,23		0,21	

Os resultados permitem comprovar a variabilidade existente na taxa de cruzamento entre populações e regiões diferentes, verificar que os resultados fornecidos pelas três metodologias são praticamente equivalentes, e que a taxa de cruzamento é maior do que se previa em função da espécie ser considerada autógama.

O que torna estes resultados mais interessantes, é terem sido estimados em suas condições naturais de

centro de diversidade e possivelmente de origem, o que pode não ocorrer na determinação da taxa de cruzamento das outras espécies de *Stylosanthes* principalmente as realizadas na Austrália. Um outro fator positivo é ter sido usado marcador aloenzimático, sem influência morfológica de atração ou repulsão sobre os insetos polinizadores, como pode ocorrer ao se usar a cor da flor. E, o ponto mais importante, para este trabalho é poder relacionar a taxa de cruzamento de cada população com as condições ambientais e outros elementos de variabilidade genética.

Na Tabela 19 está o resumo da taxa média de cruzamento de cada uma das três regiões ecogeográficas, obtidas através de três metodologias diferentes. Ao considerar os valores observa-se tanto neste resumo como nas Tabelas 16 e 17, que existe um aumento da proporção da taxa de cruzamento da Mata para o Sertão, com taxas médias mais baixas na Mata e mais elevadas no Sertão e com diferenças insignificantes entre o Sertão e o Agreste. Estes resultados se confundem bastante com os da variabilidade e são opostos a divergência genética.

Sabendo-se que a autofertilidade está condicionada a habilidade da planta produzir sementes na ausência de polinizadores, é possível que esteja associada a vantagem da homozigose em populações colonizadoras marginais. É o que parece ter ocorrido no início e fim do período de floração do ensaio de campo e nas populações da Mata.

Estes resultados vem confirmar CLEGG (1980) ao afirmar que a taxa de cruzamento intermediária é o que geralmente ocorre em plantas e não a dicotomia entre autofertilização e cruzamento. Sabe-se que as espécies intermediárias tem a vantagem de usar das vantagens das autógamias e

das alógamas. Isto é, através de cruzamentos, estas espécies promovem a heterozigosidade com suas vantagens seletivas e manifestação do vigor híbrido, e através da autofertilização leva a homozigose que além de poder fazer uso do vigor da pureza genética (própria das autógamias), propicia a eliminação de genes deletérios.

O reconhecimento do *S. humilis* como uma espécie de fecundação de tipo intermediário é importante porque todas as investigações da estrutura e dinâmica genética são direta ou indiretamente relacionadas com os processos reprodutivos.

4.4. Relação da variabilidade morfo-isoenzimática com a variabilidade ecogeográfica

Os vegetais são um material muito apropriado para estudar a relação entre a variação genética e ambiental, porque seu hábito sedentário permite uma delimitação e quantificação bastante precisa de seus habitats. Segundo DOBZHANSKY (1970), provavelmente a maior parte do polimorfismo é adaptativamente importante em relação a heterogeneidade ambiental no tempo e no espaço.

A Figura 25 ilustra as frequências dos tipos de inflorescência encontrados nas 25 populações estudadas, as três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Este caráter de segregação genética comprovada nos experimentos de Anhembi, Piracicaba, mas cuja ação gênica não foi determinada, mostra uma distribuição semelhante ao padrão de variação isoenzimática. O caráter parece ter outras variáveis intermediárias entre a inflorescência em capítulo e espiguetas, apresentando-se uniforme na Mata, com variação no

MATA										AGRESTE										SERTÃO									
TIPO DE INFLORESCÊNCIA					A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	X	Y	Z
CAPÍTULO					1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,43	0,50	0,50	0,21	0,41	0,66	0,34	0,27	0,19	0,50	0,64	0,68	0,95	0,65	0,71	0,24	0,61	0,35	0,40	1,00
ESPIGUETA					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,50	0,50	0,19	0,59	0,34	0,46	0,73	0,21	0,50	0,36	0,32	0,05	0,35	0,29	0,76	0,39	0,65	0,60	0,00

FIGURA 25. Frequência e diagrama do tipo de inflorescência encontrada nas 25 populações de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Agreste e Sertão, com exceção da população do extremo oeste Z que é uniforme.

Este caráter morfológico, juntamente com outro, o da pilosidade, também foi analisado no ensaio de blocos casualizados em Anhembi, Piracicaba. Na Tabela 20 estão relacionadas as frequências das variantes morfológicas do tipo de inflorescência, e pilosidade dos 20 tratamentos do ensaio. A frequência e distribuição dos tipos de inflorescência de cada tratamento acompanhou o mesmo padrão visto na Figura 25 que apresentou o caráter nos locais de origem destes tratamentos.

Não é possível determinar o fator de seleção que favoreceu este polimorfismo em regiões instáveis e secas. Entretanto, supõe-se haver alguma vantagem relacionada com um período de tempo maior de floração das plantas com inflorescência em espiguetas, tendo em vista a observação em campo de que as flores da espiguetas, mais próximas ao pedúnculo são as primeiras a abrir e a formar as sementes em relação às da extremidade. Este fator seria seletivamente importante por propiciar a formação de sementes em condições climáticas mais favoráveis e favorecer o cruzamento por ter mais flores abertas durante um período mais longo. Em condições de estresse hídrico, o caráter em espiguetas parece não se manifestar completamente, ocorrendo uma floração mais rápida, um menor número de sementes com a secagem da planta em seguida. Isto foi observado na geração F_1 de plantas com espiguetas em casa de vegetação.

A Figura 26 ilustra a frequência da distribuição do caráter pilosidade do caule de *S. humilis* dos 20 tratamentos do ensaio em Anhembi, Piracicaba. Este caráter genético apresenta um polimorfismo maior, com as três va-

TABELA 20. Frequência ou valores médios dos caracteres analisados do ensaio de *S. humilis* em Anhembi, Piracicaba, SP, com 4 repetições e 20 tratamentos obtidos a partir da análise genética de aloenzimas e dos diferentes caracteres do ambiente de origem. Piracicaba, SP, 1987.

Trata- mentos	Região	Tipos de inflores- cência		Pilosidade			Início de floração dias		Comp. pe- cíolo fo- liar (cm)		Comp. in- ternódio (cm)		Folículo central (CxL)(cm)		Folículo lateral (CxL)(cm)		Área basal (m²)		Matéria verde (kg)		Matéria seca (kg)	
		C	E	0	1	2	$\bar{X}$	$\pm$ s	$\bar{X}$	$\pm$ s	$\bar{X}$	$\pm$ s	$\bar{X}$	$\pm$ s	$\bar{X}$	$\pm$ s	$\bar{X}$	$\pm$ s	$\bar{X}$	$\pm$ s	$\bar{X}$	$\pm$ s
Pop. B	Mata	1,00		1,00			146 ⁺ 3,64	0,53 ⁺ 0,13	0,53 ⁺ 0,13	2,94 ⁺ 0,58	0,64 ⁺ 0,29	0,38 ⁺ 0,15	1,27 ⁺ 0,13	1,79 ⁺ 0,67	0,57 ⁺ 0,15							
Pop. E	Mata	1,00		0,50	0,50		146 ⁺ 0,00	0,64 ⁺ 0,07	0,64 ⁺ 0,07	3,72 ⁺ 0,54	0,68 ⁺ 0,12	0,54 ⁺ 0,13	1,73 ⁺ 0,36	3,42 ⁺ 1,46	1,18 ⁺ 0,59							
Pop. D	Mata	1,00		1,00			146 ⁺ 3,52	0,63 ⁺ 0,11	0,63 ⁺ 0,11	3,72 ⁺ 0,97	0,70 ⁺ 0,16	0,55 ⁺ 0,17	1,74 ⁺ 0,51	1,68 ⁺ 1,30	0,57 ⁺ 0,42							
Bulk 1	Mata	1,00		0,28	0,72		146 ⁺ 5,26	0,52 ⁺ 0,07	0,52 ⁺ 0,07	3,38 ⁺ 0,70	0,50 ⁺ 0,13	0,35 ⁺ 0,11	2,00 ⁺ 0,41	3,31 ⁺ 1,50	1,19 ⁺ 0,60							
Bulk 2	Mata	1,00		0,25	0,75		145 ⁺ 2,93	0,57 ⁺ 0,08	0,57 ⁺ 0,08	3,10 ⁺ 0,66	0,63 ⁺ 0,16	0,46 ⁺ 0,13	1,42 ⁺ 0,76	1,29 ⁺ 0,84	0,52 ⁺ 0,40							
Média da Mata		1,00	0,00	0,41	0,59	0,00	145,80	0,58	0,58	3,37	0,63	0,46	1,63	2,31	0,81							
Amplitude							138-152	0,41-0,69	0,41-0,69	2,20-4,53	0,36-0,97	0,24-0,74	0,64-2,39	0,50-5,22	0,14-1,90							
Fam.1 H	Agreste	1,00		0,83	0,17		146 ⁺ 4,63	0,60 ⁺ 0,12	0,60 ⁺ 0,12	2,95 ⁺ 0,47	0,70 ⁺ 0,16	0,49 ⁺ 0,12	1,13 ⁺ 0,82	0,56 ⁺ 0,47	0,18 ⁺ 0,14							
Fam.2 I	Agreste	1,00		0,30	0,70		150 ⁺ 2,93	0,49 ⁺ 0,12	0,49 ⁺ 0,12	2,62 ⁺ 0,89	0,53 ⁺ 0,25	0,39 ⁺ 0,19	0,98 ⁺ 1,11	0,72 ⁺ 0,76	0,24 ⁺ 0,26							
Fam.3 J	Agreste	1,00		1,00			146 ⁺ 3,84	0,60 ⁺ 0,11	0,60 ⁺ 0,11	3,65 ⁺ 0,66	0,80 ⁺ 0,23	0,61 ⁺ 0,19	2,23 ⁺ 0,87	2,35 ⁺ 1,63	0,80 ⁺ 0,53							
Pop. I	Agreste	0,62	0,38	0,16	0,84		146 ⁺ 5,26	0,58 ⁺ 0,12	0,58 ⁺ 0,12	3,57 ⁺ 0,98	0,70 ⁺ 0,21	0,54 ⁺ 0,21	2,46 ⁺ 0,86	3,71 ⁺ 1,65	1,34 ⁺ 0,57							
Pop. K	Agreste	0,42	0,58	0,31	0,69		147 ⁺ 6,46	0,48 ⁺ 0,14	0,48 ⁺ 0,14	3,58 ⁺ 0,96	0,62 ⁺ 0,27	0,46 ⁺ 0,22	1,80 ⁺ 1,00	1,93 ⁺ 1,90	0,70 ⁺ 0,67							
Pop. M	Agreste	1,00		0,31	0,69		148 ⁺ 4,10	0,52 ⁺ 0,10	0,52 ⁺ 0,10	3,82 ⁺ 0,76	0,65 ⁺ 0,15	0,46 ⁺ 0,13	1,48 ⁺ 0,86	1,42 ⁺ 1,56	0,44 ⁺ 0,46							
Pop. Q	Agreste	1,00		0,29	0,71		149 ⁺ 4,47	0,52 ⁺ 0,11	0,52 ⁺ 0,11	3,57 ⁺ 0,74	0,61 ⁺ 0,27	0,49 ⁺ 0,26	2,27 ⁺ 0,29	1,68 ⁺ 0,73	0,58 ⁺ 0,25							
Bulk 3	Agreste	0,40	0,60				148 ⁺ 4,03	0,55 ⁺ 0,14	0,55 ⁺ 0,14	3,72 ⁺ 0,50	0,61 ⁺ 0,27	0,44 ⁺ 0,23	2,43 ⁺ 1,01	3,51 ⁺ 1,85	1,12 ⁺ 0,62							
Bulk 4	Agreste/ Sertão	0,53	0,47	0,17	0,83		143 ⁺ 6,26	0,55 ⁺ 0,06	0,55 ⁺ 0,06	3,52 ⁺ 0,31	0,63 ⁺ 0,17	0,50 ⁺ 0,14	2,32 ⁺ 0,54	2,90 ⁺ 1,18	1,00 ⁺ 0,39							
Média do Agreste		0,55	0,45	0,26	0,74	0,00	147,00	0,54	0,54	3,34	0,65	0,49	1,90	2,09	0,71							
Amplitude							132-152	0,31-0,76	0,31-0,76	1,40-4,80	0,24-1,08	0,17-0,87	0,01-3,46	0,04-5,35	0,02-1,86							
Fam.1 Q	Sertão	0,85	0,15	0,20	0,33	0,47	148 ⁺ 4,24	0,55 ⁺ 0,07	0,55 ⁺ 0,07	3,61 ⁺ 0,43	0,64 ⁺ 0,18	0,49 ⁺ 0,18	1,27 ⁺ 0,46	0,86 ⁺ 0,48	0,27 ⁺ 0,15							
Fam.2 U	Sertão	1,00		1,00			144 ⁺ 5,93	0,53 ⁺ 0,04	0,53 ⁺ 0,04	3,47 ⁺ 0,42	0,61 ⁺ 0,07	0,47 ⁺ 0,07	2,30 ⁺ 0,12	2,70 ⁺ 0,65	0,96 ⁺ 0,24							
Pop. Q	Sertão	0,41	0,59	0,17	0,61	0,22	145 ⁺ 6,37	0,51 ⁺ 0,05	0,51 ⁺ 0,05	3,25 ⁺ 0,82	0,55 ⁺ 0,14	0,42 ⁺ 0,11	2,16 ⁺ 0,78	2,90 ⁺ 1,39	1,04 ⁺ 0,47							
Pop. T	Sertão	0,89	0,11	0,37	0,63		146 ⁺ 3,86	0,57 ⁺ 0,04	0,57 ⁺ 0,04	3,42 ⁺ 1,14	0,63 ⁺ 0,15	0,45 ⁺ 0,03	1,42 ⁺ 0,51	1,25 ⁺ 0,55	0,49 ⁺ 0,21							
Pop. Z	Sertão	1,00		1,00			136 ⁺ 3,86	0,47 ⁺ 0,36	0,47 ⁺ 0,36	2,47 ⁺ 0,36	0,46 ⁺ 0,11	0,34 ⁺ 0,10	1,75 ⁺ 0,69	2,71 ⁺ 0,77	1,09 ⁺ 0,43							
Bulk 5	Sertão	0,63	0,37	0,58	0,42		138 ⁺ 5,94	0,56 ⁺ 0,06	0,56 ⁺ 0,06	3,00 ⁺ 0,98	0,60 ⁺ 0,13	0,47 ⁺ 0,12	2,41 ⁺ 0,62	2,64 ⁺ 0,57	1,04 ⁺ 0,17							
Média do Sertão		0,63	0,37	0,55	0,33	0,12	142,83	0,53	0,53	3,20	0,58	0,44	1,88	2,18	0,82							
Amplitude							132-152	0,34-0,62	0,34-0,62	1,77-4,90	0,31-0,80	0,21-0,64	0,59-3,15	0,41-4,54	0,09-1,68							

C = capitulo; E = espigeta ; 0 = liso; 1 = pequena pilosidade; 2 = pilosidade densa.

FIGURA 26. Diagrama da frequência de plantas (0 = lisas; 1 = pequena pilosidade; 2 = pilosidade densa), de *S. humilis* observadas no ensaio de campo em Anhembi, Piracicaba, SP, distribuídas de conformidade com as regiões de origem. Piracicaba, SP, 1987.

riantes (ausência, muita e pouca pilosidade) no Sertão e uma frequência alta de pilosidade pouco densa no Agreste e na Mata. Segundo CAMERON & IRWIN (1986), o caráter pilosidade no caule de *Stylosanthes guianensis* é controlado por um único gene dominante, o qual foi usado pelos autores como marcador para determinar a taxa de cruzamento desta espécie e também para marcador do progresso de seleção para aumento da taxa de cruzamento com a finalidade de disseminar o gene para resistência a antracnose em populações de *S. guianensis*.

A Tabela 20 apresenta também o número médio de dias para início de floração com o desvio padrão de cada tratamento do ensaio, cuja média e amplitudes de floração estão ilustradas na Figura 27. Dois fatores principais parecem estar influenciando o início de florescimento, o fotoperíodo único, que dá uma certa uniformidade geral na média dos tratamentos de diferentes origens, e a variação na amplitude, principalmente dos tratamentos originados no Sertão, que possivelmente além de uma maior dormência de suas sementes (BARRIGA, 1979), foram selecionadas para o florescimento precoce por ser uma região cujo período de chuvas é antecipado de dois a três meses, em relação as outras duas regiões (Tabela 1, pág. 36). Esta antecipação do período chuvoso em relação ao fotoperíodo único, deve influir mais sobre a flexibilidade da amplitude de florescimento do que sobre uma alteração genética tornando as populações mais precoces como se observa pela pequena antecipação das médias de florescimento dos tratamentos oriundos do Sertão (Figura 27).

Mais do que relacionar os caracteres morfológicos com seus ambientes, este trabalho pretende principalmente estabelecer um paralelo que relacione os caracteres quantitativos agrônômicos com as informações genéticas isoenzimáticas e ambientais. Com esta finalidade, na Tabela 20,

FIGURA 27. Diagrama da amplitude de início de florescimento de cada um dos 20 tratamentos de *S. humilis* obtidos no ensaio de Anhembi, Piracicaba, SP, 1987.

estão relacionados os valores médios dos 20 tratamentos do ensaio com blocos casualizados para sete caracteres poligênicos, que serão estudados através da análise da variância.

Dos sete caracteres dimensionados, o comprimento do pecíolo foliar e o peso de matéria verde, tiveram maiores médias nos tratamentos originados na Mata. Não obstante serem as mesmas plantas utilizadas para obtenção dos pesos verde e seco, as plantas da zona da Mata apresentaram maior peso verde em relação as do Sertão. Com relação ao peso seco, contrariamente, as plantas do Sertão apresentaram maior peso. Este resultado tanto pode ser causado por um fator genético fisiológico que levou as populações de regiões secas possuírem um menor teor de água em seus tecidos, como também a maior precocidade das plantas do Sertão terem proporcionado menor quantidade de água em seus tecidos mais amadurecidos no momento da pesagem da matéria verde. Nos outros quatro caracteres, comprimento do internódio, índices do folíolo central e folíolo lateral, e área basal, o Agreste teve as maiores médias, seguido pela Mata, com a única exceção da área basal da planta em que o Sertão seguiu o Agreste com média superior a região da Mata. Além das médias por região a Tabela 20 também apresenta as amplitudes dos sete caracteres poligênicos. Em todos eles o Agreste apresenta as maiores amplitudes.

Estes resultados confirmaram as informações do padrão isoenzimático quanto a distribuição do polimorfismo e da heterogeneidade das populações naturais de origem destes tratamentos. HAMRICK & ALLARD (1975), já haviam observado em aveia (*A. barbata*) que a variação observada em vários caracteres quantitativos, como tempo de floração, tempo de amadurecimento da semente, peso e número de perfilhos em populações naturais eram relacionados com as diferenças

aloenzimáticas. Um razoável número de outras publicações também demonstraram correlações positivas entre o grau de variabilidade morfológica e aloenzimática em plantas e animais.

Valores médios superiores na Mata ou Agreste dos caracteres de produção de matéria verde em geral, eram esperados, pois é sabido que a seleção em condições climáticas mais propícias tende a favorecer a alocação de mais energia para o desenvolvimento da parte vegetativa, importante na competição (estrategista k) do que as populações precoces e em condições climáticas limitadas como as do Sertão.

O objetivo das investigações feitas com isoenzimas tem sido analisar o padrão de variação que ocorre em condições naturais e tentar correlacioná-los com alguma força seletiva. A avaliação dos padrões de variação das aloenzimas juntamente com a variação dos caracteres quantitativos são analisados em função de seus ambientes de origem, para entender o significado biológico deste polimorfismo. A seleção natural poderá se diferenciar para diferentes funções enzimáticas, uma vez que os alelos envolvidos numa função ecológica adaptativa podem variar independentemente dos que estiverem envolvidos com outras funções.

A adaptação das populações a seus ambientes é uma resposta complexa, que é afetada por muitas funções de interação entre indivíduo e população, incluindo morfologia, fisiologia, bioquímica, sistema reprodutivo e comportamento cromossômico.

Nesta relação das características morfo-isoenzimáticas com as do ambiente natural de origem, é preciso

ter sempre presente que a evolução a nível de diversidade genética de uma amostra é um problema diferente da evolução de suas características agronômicas. Estas só são relacionadas quando a característica agronômica representa um elemento favorável na estratégia de adaptação, competição e sobrevivência da espécie.

A Tabela 21 apresenta o resumo da análise da variância dos sete caracteres quantitativos avaliados através de um ensaio com 20 tratamentos e 4 repetições em Anhembi, Piracicaba. Cinco dos sete caracteres mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. Apenas os caracteres comprimento do internódio e o índice do folíolo central não tiveram diferenças significativas entre seus tratamentos.

Os caracteres comprimento do pecíolo foliar e os índices de folíolo central e lateral apresentaram diferenças significativas entre as repetições. Estas diferenças foram causadas possivelmente pelas alterações sofridas nas dimensões das estruturas do folíolo e pecíolo foliar com a diferença de amadurecimento das plantas, tendo em vista que dois blocos tiveram seu material coletado e herbarizado 15 dias antes dos outros dois. Nos dois blocos da coleta posterior, as plantas já estavam no período de floração, o que não ocorria na primeira coleta. Com o início da floração e produção de sementes, as folhas novas das extremidades do *S. humilis* são menores e as mais velhas ficam amareladas, desidratadas e caem.

Os coeficientes de variação (CV) (Tabela 21), da área basal, peso de matéria verde e matéria seca são muito altos e os demais são médios. Para melhor avaliar o CV alto encontrado praticamente em todos estes caracteres, é

TABELA 21. Resumo da análise de variância individual dos dados de sete características, obtidos no ensaio de campo em Anhembi, Piracicaba, com tratamentos a nível de informação ambiental, populacional e genética, de *S. humilis* originária - rio do Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios						
		Área basal (m ²)	Matéria verde (kg)	Matéria seca (kg)	Comprimento foliar (cm)	Folículo central índice (CxL)	Folículo lateral índice (CxL)	Comprimento internódio (cm)
Repetição	3	0,154472ns	0,7307ns	0,0708ns	0,1151**	0,4497**	0,3974**	0,8174ns
Tratamento	19	0,014801*	3,8641**	0,5009**	0,0039*	0,0237ns	0,0166**	0,5908ns
Resíduo	57	0,501515	1,4656	0,1843	0,0042	0,0146	0,0091	0,5212
Média		1,8301	2,17	0,77	0,55	0,62	0,47	3,36
CV(%)		52,3	90,6	92,3	17,2	24,8	27,4	22,9
Desdobramento								
01. Mata (M) vs. (Ser- tão + Agreste)	1	0,310	0,4549	0,0411	0,0220*	0,0020	0,0005	0,0099
02. Sertão (S) vs. Agreste (A)	1	0,0032	0,2044	0,1546	0,0028	0,0871*	0,0354	0,8410
03. Bulk (M) vs. Bulk (A+S)	1	2,1628*	2,2770	0,1856	0,0003	0,0094	0,0161	0,2394
04. Bulk (B) vs. Pop. (P)	1	1,2505	3,2769	0,4142	0,0001	0,0084	0,0103	0,0492
05. Bulk (B) vs. Fam. (F)	1	2,8409**	17,0694**	2,3281**	0,0006	0,0422	0,0221	0,0748
06. Pop. (P) vs. Fam. (F)	1	0,6855	8,7642*	1,2505*	0,0013	0,0210	0,0005	0,2891
07. P(E+O+T) vs. P(D+I+Q)	1	3,5733**	0,0070	0,3314	0,0000	0,0045	0,0006	0,0198
08. P(E+O) vs. P(D+I+Q)	1	0,0686	0,2134	0,0517	0,0116	0,0000	0,0006	0,0811
09. P(T) vs. P(I)	1	2,1528*	12,1032**	1,4535**	0,0003	0,0338	0,0162	0,0392
10. P(E) vs. P(Z)	1	0,0008	1,0224	0,0171	0,0578**	0,0989*	0,0800**	3,1105*
11. F(Q) vs. F(U)	1	2,1012*	6,7528*	0,9560*	0,0006	0,0018	0,0010	0,0392
12. P(Q) vs. P(T)	1	1,0878	5,4780	0,6216	0,0078	0,0003	0,0021	0,0612
13. P(O) vs. P(Q)	1	0,0242	2,9890	0,4324	0,0003	0,0078	0,0151	0,2016
14. P(D) vs. P(I)	1	1,0512	8,2215*	1,1858*	0,0050	0,0000	0,0003	0,0496
15. P(B) vs. P(K)	1	0,5671	0,0378	0,0378	0,0045	0,0008	0,0001	0,8256
16. P(I) vs. P(M+O)	1	0,9087	12,4273**	1,8260**	0,0108	0,0108	0,0108	0,0451
17. P(I) vs. P(B)	1	2,8322*	7,3536*	1,1858**	0,0065	0,0060	0,0136	0,7750
18. P(B+E+D) vs. P(K+T)	1	0,0059	2,4254	0,1499	0,0259*	0,0301	0,0175	0,0094
19. P(K) vs. P(T)	1	0,2888	0,9248	0,0968	0,0162	0,0060	0,0003	0,0512
Tratamento	(19)							
Resíduo	57	0,5015	1,4656	0,1843	0,0042	0,0146	0,0091	0,5212

* : significativo a 5% pelo teste F.

** : significativo a 1% pelo teste F.

ns : não significativo.

necessário considerar o tipo de material e o tipo de tratamento que estão sendo analisados. O material, *S. humilis* coletado no Estado de Pernambuco, é completamente silvestre, nunca sofreu seleção para adaptação ou melhoramento pelo homem, originou-se desde o centro de diversidade da espécie até de populações isoladas e marginais de condições ecogeográficas distintas. Os tratamentos variam desde "bulk" de regiões amplas até famílias, passando por populações. Com a variação deste amplo material genético cujo ensaio foi realizado num ambiente completamente distinto das três regiões de origem, seria praticamente injustificável obter um CV baixo para todos estes caracteres.

A maior parte dos trabalhos de melhoramento de caracteres agrônômicos, utiliza-se das informações expressas pelo caráter e seu ambiente. Sabe-se que a grande maioria dos caracteres fenotípicos são controlados por vários locos e geralmente afetados pelo ambiente. Mesmo obtendo os parâmetros da herdabilidade do caráter, detalhes da atuação genética dos caracteres quantitativos são muito limitados e imprecisos o que dificulta sua manipulação no processo seletivo do melhoramento. Por isto, os dados eletroforéticos propiciam uma importante fonte de marcadores genéticos que podem ser usados em numerosos programas experimentais, podendo ou não considerar as funções metabólicas dos produtos enzimáticos ou da representatividade dos genes (GOTTlieb, 1977).

Foi com o auxílio genético das aloenzimas cujas amostras foram previamente analisadas e com as informações dos dados ambientais de cada amostra, que foram elaboradas as hipóteses expressas pelos tratamentos do ensaio, cujas significâncias foram testadas pela utilização de contrastes na análise da variância.

Na Tabela 22 são apresentados os sete caracteres biológicos que foram dimensionados e seus dados utilizados para avaliar as hipóteses propostas. Para facilitar a compreensão das hipóteses e testar sua significância, os tratamentos tiveram seus graus de liberdade, em número de 19, desdobrados em 19 contrastes, os quais são especificados nesta tabela.

Os contrastes do desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos estão enumerados (Tabela 21), de conformidade com as especificações detalhadas na Tabela 22. O número relativamente grande de graus de liberdade usados no desdobramento, reduz o rigor da significância de seus contrastes. Esta observação pode explicar a significância de dois contrastes na análise do caráter folíolo central e um no caráter comprimento do internódio, cujos tratamentos não apresentavam diferenças significativas. Isto apenas põe em dúvida a significância de valores de F muito próximos ao limite de 5%, que foi o que deve ter ocorrido nos casos descritos acima e possivelmente em alguns mais nos outros caracteres cuja significância pode ter ocorrido por mera casualidade.

O efeito de região, tanto da Mata vs (Sertão+Agreste) (contraste 1) como Sertão vs Agreste (contraste 2), surpreendentemente não mostraram diferenças significativas, a não ser muito debilmente a nível de 5%, nos caracteres comprimento do pecíolo foliar que favorece o (Agreste + Sertão) no contraste 1 e no contraste 2 o índice do folíolo central, o Agreste é favorecido.

Nas comparações entre "bulks", populações e famílias, nenhum caráter apresentou diferenças significativas no contraste 4, entre "bulks" e populações. Maiores di-

TABELA 22. Caracteres biológicos de *S. humilis*, medidos e analisados através das informações de um ensaio de campo desenvolvido em Anhembi, Piracicaba, SP, com 4 blocos ao acaso, 20 tratamentos e 5 plantas por parcela, contrastando as informações genéticas (isoenzimáticas) e ambientais. Piracicaba, SP, 1987.

Caracteres biológicos	Período de medida	Unidade de medida
A. Peso de matéria verde	início da floração	kg
B. Peso de matéria seca	início da floração	kg
C. Área basal da planta	início da floração	m ²
D. Comprimento médio do pecíolo foliar	início da floração	cm
E. Comprimento médio do internódio	início da floração	cm
F. Índice (comprimento x largura) do folíolo central	início da floração	cm
G. Índice (comprimento x largura) do folíolo lateral	início da floração	cm

Fonte de variação - Desdobramento dos GL dos tratamentos

1* a.⁺ (M) Região da Mata:

Populações: P.B - População B

P.E - População E

P.D - População D

"Bulks": B.1 - populações de toda região

B.2 - populações de Tamandaré

b. (A) Região do Agreste:

Famílias: F.H - uma família da população H

F.I - uma família da população I

F.J - uma família da população J

Populações: P.I - População I

P.K - População K

P.M - População M

P.O - População O

- continua -

"Bulks": B.3 - populações do Agreste
 B.4 - populações do Agreste-Sertão

(S) Região do Sertão:

Famílias: F.Q - uma família da população Q

F.U - uma família da população U

Populações: P.Q - População Q

P.T - População T

P.Z - População Z

"Bulk": : B.5 - populações do Sertão

2. a. (S) - Região do Sertão
 b. (A) - Região do Agreste
3. a. "Bulk" da região da Mata (M)
 b. "Bulks" das regiões do agreste (A) e Sertão (S)
4. a. "Bulks" (B) das 3 regiões
 b. Populações (P) das 3 regiões
5. a. "Bulks" (B) das 3 regiões
 b. Famílias (F) das 2 regiões (Agreste - Sertão)
6. a. Populações (P) das 3 regiões
 b. Famílias (F) das 3 regiões
7. a. P(E+O+T) - Populações de menor polimorfismo e diversidade genética de cada região.
 b. P(D+I+Q) - Populações de maior polimorfismo e diversidade genética de cada região.
8. a. P(E+O) - Populações de menor polimorfismo e diversidade genética das regiões da Mata e Agreste.
 b. P(D+I+Q) - (ver 7.b).
9. a. P(T) - População de menor polimorfismo e diversidade genética da região do Sertão.
 b. P(I) - População de maior polimorfismo e diversidade genética da região do Agreste.
10. a. P(E) - População do extremo leste.
 b. P(Z) - População do extremo oeste.
11. a. F(Q) - Família coletada em margem de rodovia
 b. F(U) - Família coletada em pastagem natural afastada de rodovias.

- continua -

12. a. P(Q) - População coletada em margem de rodovia.
b. P(T) - População coletada em pastagem natural afastada de rodovias.
13. a. P(O) - População com menor amostragem de coleta.
b. P(Q) - População com maior amostragem de coleta.
14. a. P(D) - Populações coletadas em menor área de extensão.
b. P(I) - Populações coletadas em maior área de extensão.
15. a. P(B) - População da região com maior precipitação média anual e menor altitude.
b. P(K) - População da região com menor precipitação média anual e maior altitude.
16. a. P(I) - População do Agreste com período de precipitação tardia (julho).
b. P(M+O) - Populações do Agreste com período de precipitação adiantado (abril).
17. a. P(I) - (ver 16.a)
b. P(B) - População da região da Mata com período de precipitação adiantado (maio).
18. a. P(B+E+D) - Populações de região com solo de alta capacidade de infiltração, solos arenoquartzosos profundos.
b. P(K+T) - Populações de região com solos de baixa capacidade de infiltração e pouco profundos.
19. a. P(K) - População de região com baixa capacidade de infiltração, pouco profundo e tipo vertisol simples
b. P(T) - População de região com baixa capacidade de infiltração, pouco profundo, composto pela associação de bruno não calcáreo e solos litólicos e eutróficos.

* 1, 2, 3, ..., 19 = Tratamentos agrupados para a análise.

+ a x b = contrastes dentro dos tratamentos agrupados.

ferenças foram achadas no contraste 5, entre "bulks" e famílias, onde tanto em peso de matéria verde como de matéria seca houve diferenças significativas a nível de 1% e a 5% no caráter área basal, com a superioridade dos "bulks". No contraste 6, entre populações e famílias, houve diferenças significativas a nível de 5% em peso de matéria verde e matéria seca com maiores valores para as populações. E, no contraste 3, entre "bulks" da Mata vs "bulks" do (Agreste + Sertão), apenas o caráter área basal mostraram diferenças significativas a 5%, com superioridade do (Agreste + Sertão).

Os contrastes de números 7, 8 e 9, são comparações com base no padrão genético aloenzimático do polimorfismo P e diversidade gênica H. O contraste 7, entre populações com maior e menor polimorfismo e diversidade de cada região, mostrou diferenças altamente significativas favorecendo as polimórficas em área basal. Entretanto, o contraste 8, mostrou que esta diferença é mais devida ao desempenho inferior da população T que é a de menor polimorfismo e diversidade do Sertão, tendo em vista que o contraste 8 sem esta população mostrou ser não significativo em todos os caracteres. O contraste 9, entre as populações T e I de menor e maior polimorfismo e heterozigosidade respectivamente, do Sertão e Agreste, apresentou diferenças altamente significativas a nível de 1% em peso de matéria verde e matéria seca e significante a nível de 5% em área basal. Para todos os três contrastes utilizando o padrão isoenzimático, as populações de maiores valores foram as mais polimórficas e com maior diversidade gênica.

Os contrastes 10, 11 e 12 foram elaborados para comparar ambientes ecogeográficos característicos. Assim sendo, o contraste 10 foi realizado entre as duas populações extremas do leste na praia e do oeste na caatinga a

uma distância aproximada de 500 km. Neste contraste mostraram diferenças altamente significativas a nível de 1% no comprimento do pecíolo foliar e no índice do folíolo lateral, e significativos a nível de 5% no índice do folíolo central e no comprimento do internódio. Em todos os quatro caracteres a população do leste teve os maiores valores. No contraste 11, entre as famílias Q e U, esta de pastagem natural afastada da rodovia, teve valores significativos superiores, a nível de 5%, em relação a família Q de beira de estrada, nos caracteres área basal, peso de matéria verde e matéria seca. O contraste 12, foi a repetição do contraste 11, com a diferença que em vez de 2 famílias foram usadas 2 populações, não apresentando nenhuma diferença significativa.

Nos contrastes 13 e 14 foram relacionados com o tamanho e área da amostragem coletada. O 13, contrastando amostragens de tamanho grande e pequeno não houve diferenças significativas. O contraste 14, foi entre amostragens coletadas de populações que ocupam pequena e grande área de extensão. A população I que ocupa a maior área amostrada teve valores significativos a nível de 5%, superiores a população D de menor área em peso de matéria verde e matéria seca.

Nos contrastes 15, 16 e 17, o fator precipitação pluviométrica anual, tanto quantidade como período foi testado. O 15, contrastando populações de região com maior e menor precipitação anual e altitudes, não apresentou diferenças significativas. Os contrastes 16 e 17 foram feitos entre populações de período de precipitação tardio (julho) do Agreste, e adiantado (abril) também do Agreste e de (maio) da Mata. As combinações de tardio (julho) com adiantado (abril), ambos do Agreste, mostrou diferenças altamente significativas a nível de 1% em peso de matéria verde e matéria seca; e

tardio (julho) com adiantado (maio) da Mata também mostrou diferenças altamente significativas a 1% em matéria seca e significativas a nível de 5% em matéria verde e área basal. Em todos os contrastes significativos, as populações de área de precipitação tardia foram superiores.

Finalmente, nos dois últimos contrastes elaborados (18 e 19), foram avaliados os tipos de solos quanto a estrutura, composição e capacidade de infiltração de água (Figura 1, pág. 38). Nestas comparações apenas houve diferenças significativas a nível de 5% em comprimento do pecíolo foliar com superioridade para as populações que ocupam solos de alta capacidade de infiltração e arenoquartzosos profundos sobre os de baixa capacidade de infiltração e pouco profundos.

Os resultados desta análise da variância dos sete caracteres obtidos das medidas do ensaio de campo, possibilitaram conhecer alguns dos fatores genéticos e ambientais que influenciaram na produção, crescimento e outras características quantitativas relacionadas a produção forrageira de *S. humilis*.

Esta análise mostrou que as regiões climáticas em si não têm influência significativa sobre os caracteres de produção como têm nas outras características como tamanho dos folíolos, pecíolos e internódio.

ANTONOVICS (1984), afirma que a melhor pesquisa para entender a importância da variação genética em populações é perguntar qual é a vantagem da variação para o indivíduo e fazer a estimativa diretamente no desempenho individual em populações naturais usando métodos experimentais. Foi assim que se testou a importância da variabilidade man-

tida pelo "bulk", população e família e ainda entre os diferentes padrões do polimorfismo e diversidade genética.

Populações com maior polimorfismo e diversidade neste ensaio sempre mostraram desempenho superior nos contrastes com diferenças significativas. Enquanto este estudo indica que o polimorfismo genético pode ser adaptativamente importante em ambientes heterogêneos, não está claro ainda se a seleção se opera em alelos eletroforéticos ou em algum outro nível.

LERNER (1954), já dizia que a heterozigosidade por si só já é adaptativa causando o "efeito tampão" que propicia adaptação ótima em ambientes com variação genética e física. Infelizmente, ainda existem poucos estudos que tenham analisado a relação entre as aloenzimas e a variação de caracteres poligênicos. TANKSLEY et alii (1981), trabalhando com seleção em tomate para caracteres quantitativos, encontrou correlações positivas entre a heterozigosidade isoenzimática e a proporção da folha, peso da semente e peso do fruto.

A influência de ambientes ecogeográficos característicos também foi relevante. As populações geograficamente mais afastadas mostraram diferenças não na produtividade de matéria como peso de matéria verde e seca e área basal e sim na proporção dos folíolos e comprimento dos pecíolos e internódios. Estes valores significativos favorecendo a população leste da praia parece ser o resultado da seleção disruptiva causada por pressões seletivas de ambientes climáticos opostos, mais que sua distância geográfica. O ambiente característico de pastagens naturais isoladas de rodovias também favoreceu, a nível de família a produção em relação a beira de rodovia. Entretanto, este não foi um re-

sultado consistente, por não se repetir a nível de população e a sua significância ter sido a nível de 5% apenas.

A produção superior de biomassa da população coletada em área mais extensa parece complementar a vantagem das populações dotadas de maior variabilidade genética, que é o que deve estar ocorrendo em populações de distribuição ampla em relação a restrita.

O fator período de precipitação, parece ter influência relevante na produção de matéria forrageira. Nos contrastes que foram significativos a precipitação em período tardio mostrou ser mais favorável a produção de biomassa porque a seleção favoreceu um maior desenvolvimento para a parte vegetativa, o que parece estar relacionado com sua vantagem competitiva.

O fator tipo de solo parece não ter influência decisiva sobre estes 7 caracteres estudados. Apenas um contraste significativo a nível de 5% favorecendo solos com alta capacidade de infiltração e profundos para o caráter comprimento do pecíolo foliar se destacou. Esta diferença deve ter ocorrido também por outras condições climáticas, como foi observado acima para este caráter.

Dos 7 caracteres analisados, o tamanho dos folíolos e comprimento do pecíolo foliar e do internódio, mostraram ser influenciados significativamente por fatores ligados a condições de regiões climáticas. O que aliás se previa, tendo em vista que a redução da área foliar se acentua a medida que aumenta a falta de água. Ao passo que, os relacionados com a produção como peso de matéria verde, peso de matéria seca e área basal, mostraram ser influenciados por fatores de variabilidade genética, como o padrão aloenzimá-

tico de polimorfismo e diversidade, a amplitude genética representada pelo "bulk" e populações naturais principalmente, as que ocupam áreas mais extensas e de período de precipitação tardio.

Este estudo mostrando maior produção forrageira em populações de regiões de período de precipitação tardio veio complementar o de BARRIGA (1979), que também trabalhou com populações de *S. humilis*, sendo uma delas do Nordeste (Ceará). Ele verificou que todas as populações apresentavam tendências para estrategistas do tipo "r", muito embora as populações precoces tenham alocado maior proporção de energia às partes reprodutivas do que as populações tardias. Sem dúvida nenhuma as populações de regiões de períodos de precipitação tardio, são populações tardias. CAMERON (1967), já havia observado também uma menor produtividade em plantas que amadurecem antes, as quais sofrem a ação da competição intraespecífica do vigor das plantas de florescimento tardio.

A noção de que existe uma relação adaptativa entre a variabilidade genética e a amplitude ecológica das populações é um tema persistente na biologia evolutiva (THODAY, 1972). Os aspectos genéticos da adaptação foram sugeridos por MARSHALL & JAIN (1968), estabelecidos teoricamente por LEVINS (1968) e experimentalmente por POWELL (1971). Uma maneira de se detectar as possíveis relações ecológicas, sugeridas e aplicadas neste estudo, é comparar níveis de variabilidade genética dentro de espécies que diferem em versatilidade ecológica.

Segundo BEGG (1972), *S. humilis* tem seu máximo desempenho como forrageira em regiões que recebem uma precipitação anual entre 800 a 1200 mm, e os limites edáfi-

cos vão desde solos de condições ótimas até muito argilosos e salinos, o que explica não haver diferenças significativas entre populações dentro destas condições ambientais testadas.

Valores significantes mostrando haver relação positiva entre a diversidade e polimorfismo com a variação ambiental não prova que exista uma relação casual direta. Entretanto, existem algumas evidências experimentais também em *Drosophila* por exemplo, onde ocorreram altos níveis de variabilidade genética associada com alta adaptação dentro de um ambiente (BEARDMORE, 1970).

Assim como a informação de um loco apenas não expressa o conteúdo genético de uma planta e menos ainda de uma população, assim também um caráter genético apenas dificilmente dará esta informação. Por isto vale-se, neste trabalho, das informações dadas por 20 locos de 5 sistemas enzimáticos diferentes, de 7 caracteres poligênicos e de várias condições ambientais decisivas na sobrevivência e adaptação da espécie. Os caracteres quantitativos utilizados para quantificar os efeitos ambientais e genéticos têm a vantagem de serem em geral fortemente influenciados pela variação do ambiente.

Para complementar este estudo, as Figuras 28 e 29 ilustram as relações negativas que existem entre a precipitação pluviométrica anual e as porcentagens da diversidade H e do polimorfismo P das 25 populações em seus ambientes naturais de origem. Em ambos os casos se obteve valores de regressão e de correlação altamente significativos, a nível de 1%. Entretanto, através do coeficiente de determinação ($r^2 = 0,66$) que existe para a relação da precipitação com a porcentagem de locos polimórficos, permite expli-

** significativo a 1% pelo teste t.

FIGURA 28. Diversidade genética (H) como função da precipitação pluviométrica anual para 25 populações de *S. humilis* no Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

$$r = -0,81^{**}$$

$$r^2 = 0,66^{**}$$

** significativo a 1% pelo teste t.

FIGURA 29. Proporção de locos polimórficos (P) como função da precipitação pluviométrica anual para 25 populações de *S. humilis*, no Estado de Pernambuco. Piracicaba, SP, 1987.

car melhor a variação das populações do que a relação com a diversidade cujo coeficiente de determinação ($r^2 = 0,40$), deixa de explicar 60% de sua variação.

Estas relações são importantes tanto para argumentar em favor de que o polimorfismo isoenzimático não é seletivamente neutro como para complementar as informações deste tópico, de que quanto mais o componente de adaptação contribuir para a adaptação total, maior intensidade imprimirá sobre a seleção direcional.

HUMPHREYS (1981), tratando especificamente da influência da precipitação sobre adaptação das forrageiras, parece justificar a relação da precipitação com o polimorfismo e diversidade genética. Segundo ele, a variabilidade de precipitação atinge regiões com pequenos períodos de seca, mesmo em climas úmidos, sem uma distribuição da precipitação pluviométrica sazonal pronunciada. As forrageiras adaptadas a climas úmidos possuem uma maior área foliar para transpiração e as raízes são mais superficiais e com isto mais vulneráveis ao déficit de umidade do que as forrageiras adaptadas a climas áridos. Daí a necessidade de uma grande versatilidade propiciada pelo polimorfismo e diversidade genética das populações de *S. humilis* em áreas intermediárias de precipitação que corresponde também as áreas de maior instabilidade de precipitação pluviométrica.

4.5. Efeito do padrão aloenzimático sobre a produção forrageira em *S. humilis*

As estimativas de produtividade de um material forrageiro como o *S. humilis*, independente do efeito ambiental pode ser obtido através de ensaios de campo. Entre-

tanto, o conhecimento dos fatores genéticos responsáveis por caracteres agronômicos poligênicos, sejam eles específicos e simples ou complexos, permanece ainda muito obscuro. O que se pode obter são os efeitos genéticos e a herdabilidade de uma cultivar ou linhagem por exemplo, sem caracterizar padrão, estrutura, composição ou elementos genéticos principais responsáveis pela variação da expressão dos caracteres quantitativos de interesse agronômico.

O conhecimento da estrutura genética básica que determina o caráter de uma espécie favoreceria imensamente a escolha do processo de seleção a ser usado no melhoramento para atingir um progresso mais rápido e eficiente.

Sabe-se que o valor total da produtividade de um caráter numa cultivar ou linhagem por exemplo corresponde a média da participação individual, onde existem genótipos superiores e outros inferiores. Não se tem um controle a nível de indivíduo, o que dificulta sua seleção.

Considerando estes fatores e valendo-se dos recursos da técnica eletroforética, foram analisados 15 locos enzimáticos de 32 plantas classificadas em dois grupos, sendo 16 as mais produtivas em matéria verde e seca e 16 as menos produtivas, avaliadas dentro de cada repetição. O ensaio de campo, foi o mesmo utilizado para a análise dos outros caracteres (ver item 4.4., pág. 128), tendo quatro repetições, oito plantas por repetição, sendo 4 mais produtivas e 4 menos produtivas.

A Tabela 23 mostra o resultado dos valores médios e porcentagens obtidos da produção de matéria seca por bloco, bem como a proporção de heterozigotos e do alelo comum mais frequente de 11 locos polimórficos analisados.

TABELA 23. Médias de produção de matéria seca, de heterozigosidade e de proporção do alelo comum mais frequente e porcentagens, de um ensaio de campo com 4 blocos casualizados, em Anhembi, Piracicaba, com 2 grupos, determinados pela produção superior e inferior de 32 plantas de *S. humilis* cujo padrão aloenzimático foi previamente determinado através de 11 locos que apresentavam polimorfismo. Piracicaba, SP, 1987.

Grupos de produção	Número plantas (N)	Repetições	Produção de Matéria seca (kg)		Heterozigosidade (h)		Proporção do alelo comum mais frequente (p)	
			$\bar{X}$	(%)	$\bar{X}$	(%)	$\bar{X}$	(%)
Superior	4	I	1,33	18,5	0,30	11,2	0,68	12,4
	4	II	1,56	21,8	0,40	14,9	0,68	12,4
	4	III	1,52	21,2	0,43	16,0	0,53	9,7
	4	IV	1,56	21,8	0,45	16,7	0,55	10,1
Total	16		5,97	83,3	1,58	58,8	2,44	44,6
Inferior	4	I	0,35	4,9	0,18	6,7	0,72	13,2
	4	II	0,20	2,8	0,45	16,7	0,79	14,4
	4	III	0,42	5,9	0,32	11,9	0,72	13,2
	4	IV	0,22	3,1	0,16	5,9	0,80	14,6
Total	16		1,19	16,7	1,11	41,2	3,03	55,4
Total geral	32		7,16	100	2,69	100	5,47	100

Dos 15 locos estudados, 11 apresentaram diferenças alélicas entre as 32 plantas escolhidas. Foi com base nestas diferenças individuais de loco para loco e de planta para planta entre os 2 grupos que foram obtidos os parâmetros genéticos aloenzimáticos. Além da heterozigosidade foi usado o padrão aloenzimático da proporção do alelo comum mais frequente, para expressar o polimorfismo a nível de indivíduo e quantificar as informações genéticas diferentes.

É necessário deixar bem claro que não se pretende reduzir toda expressão fenotípica do caráter de produtividade forrageira tendo como causa a ação individual de 11 locos enzimáticos. As unidades hereditárias aqui estudadas indubitavelmente, por seus resultados, não representam simplesmente locos e sim segmentos cromossômicos marcados pelos locos estudados. A seleção natural é a força primária atuando nos genótipos sobreviventes, os quais operam com intensidade diferente nos vários segmentos cromossômicos carregando os genes marcadores.

Os locos enzimáticos como os demais, não podem ser considerados isolados. COCKERHAM & RAWLINGS (1967) mostraram que, quando a seleção afeta proporções genotípicas em alguns locos em populações com predominância de autofertilização, outros locos, os quais são por si só neutros, podem mostrar excesso de heterozigotos.

Os resultados apresentados na Tabela 23, permitem ver com bastante clareza uma relação positiva da produtividade com a heterozigosidade e negativa com a proporção do alelo comum mais frequente. Para testar a significância da relação entre a produtividade de matéria seca (e verde) e os padrões aloenzimáticos da heterozigosidade e da proporção do alelo comum mais frequente, foi feita a análise da

variância, resumida na Tabela 24. Os resultados desta análise mostram realmente que existem diferenças significativas a nível de 5% entre as proporções de heterozigotos dos dois grupos formados pelos mais e menos produtivos de matéria seca. E, com base nas médias de cada grupo (Tabela 24), observa-se que o grupo de produtividade superior é o que possui a maior heterozigosidade média.

TABELA 24. Resumo da análise da variância individual dos dados obtidos no ensaio de campo em Anhembi, Piracicaba, com dois grupos formados por plantas de produção superior e inferior de matéria seca em *S. humilis*, cujas plantas individuais tiveram o padrão genético previamente determinado. Dados transformados em arc sen $\sqrt{\% 100}$. Piracicaba, SP, 1987.

Fonte de variação	GL	Heterozigosidade	Alelo comum mais frequente
		QM	QM
Repetições	3	338,1969**	207,5993**
Grupos	1	1098,9843*	690,0180*
Erro	3	100,7726**	66,3067ns
Dentro	24	16,5681	22,1131
Grupo superior		$\bar{X}_S = 0,389$	$\bar{X}_S = 0,616$
Grupo inferior		$\bar{X}_I = 0,204$	$\bar{X}_I = 0,765$

* : significativo a 5% pelo teste F

** : significativo a 1% pelo teste F

ns : não significativo.

Em relação ao alelo comum mais frequente, as diferenças entre os dois grupos também mostraram ser significativas a nível de 5%. Sendo que, ao considerar as médias, observa-se que o grupo de maior produtividade possui uma média da proporção do alelo comum mais frequente menor do que o grupo de maior produtividade.

Os resultados expressos pelas médias significativas, testadas pela análise da variância estão ilustradas na Figura 30. O fato da produção forrageira ser inversamente proporcional a proporção do alelo comum mais frequente está confirmando a hipótese de que quanto maior a proporção de informação genética diferente, melhor é seu desempenho total. Tendo em vista que quanto menor a proporção do alelo comum mais frequente maior será a proporção de alelos diferentes presentes. Assim, como o heterozigoto contém no mínimo dois produtos gênicos, os quais conferem uma diversidade bioquímica que o torna mais adaptativo por seu efeito homeostático principalmente em ambientes instáveis, assim também, aumentando a diversidade dos alelos, aumenta o número de produtos gênicos que vêm favorecer sua capacidade adaptativa.

A adaptação pode muitas vezes aumentar com a divergência de isoenzimas exibindo especificidade diferenciada, diferentes controles regulatórios e diferenças na expressão durante o desenvolvimento, que fazem com que haja uma maior flexibilidade metabólica que se expressa na produção forrageira final.

FIGURA 30. Relação entre a produção de matéria seca (kg/planta) e o grau de heterozigosidade (gráfico superior) e a proporção do alelo comum mais frequente (gráfico inferior), de 11 locos isoenzimáticos obtidos pela análise de dois grupos de plantas - de produção superior e inferior - num ensaio de campo em Anhembi, Piracicaba. Piracicaba, SP, 1987.

5. CONCLUSÕES

Os resultados discutidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a. O polimorfismo isoenzimático nas populações naturais de *S. humilis*, é função da variação ambiental.
- b. A variabilidade genética expressa pela diversidade gênica H é uma evidência da resposta imediata às condições ecogeográficas, principalmente das relacionadas ao clima, solo e tamanho da população.
- c. As populações da região do Agreste, não obstante serem as de menor área, e apresentarem as melhores condições de fluxo gênico por serem todas de beira de rodovia e relativamente próximas, são as que apresentaram maior variabilidade em todos os níveis genéticos estudados como, frequências alélicas, proporção de locos polimórficos, número médio de alelos por loco e diversidade gênica.
- d. As condições ecogeográficas extremas das regiões da Mata e Sertão são acompanhadas por dois padrões de variabilidade de uniformes e distintos, com valores maiores para o Sertão, sendo ambos os padrões interligados pela grande amplitude de variação do Agreste que ocupa a região inter-

mediária e que apresenta valores que extrapolam os das outras duas regiões.

- e. Tendo como base níveis de variabilidade, taxas de cruzamento, distribuição aleatória das frequências gênicas e distâncias gênicas obtidas entre as populações da região da Mata e entre esta região e as outras duas, concluiu-se que as populações da Mata obedecem a uma distribuição marginal, cujo estreitamento da variabilidade deve ter sido ocasionado pelo efeito do fundador, levando à deriva genética.
- f. As populações das regiões do Agreste e Sertão apresentam todas as condições próprias de centro de diversidade genética da espécie.
- g. A variação da taxa de cruzamento durante o período de floração é proporcional ao número de plantas florescidas. Observou-se que quanto maior o número de plantas floridas maior o número de insetos polinizadores presentes.
- h. As taxas de cruzamento em *S. humilis* de cada região eco-geográfica são proporcionais aos valores da variabilidade e inversamente proporcionais a divergência genética.
- i. Os resultados das três metodologias usadas para determinar a taxa de cruzamento mostraram ser equivalentes, com variação bastante grande entre populações e regiões que apresentaram médias que variam de 21% a 32%.
- j. As diferentes regiões climáticas não têm influência significativa na seleção de caracteres de produção forrageira, mas têm sobre a área foliar, comprimento do pecíolo foliar e do internódio, que estão relacionados com o fator hídrico.

- l. A variabilidade genética exerce função importante para o desenvolvimento de caracteres quantitativos de produção forrageira em ambientes heterogêneos.
- m. As populações provenientes de regiões de precipitação tardia alocam mais energia para a produção de biomassa do que as populações precoces provenientes de regiões onde a precipitação ocorre mais cedo.
- n. Existe uma relação negativa entre a variabilidade expressa pelo polimorfismo e diversidade gênicos e a precipitação pluviométrica anual, justificando a alta adaptação do *S. humilis* as condições semi-áridas.
- o. A produtividade forrageira do *S. humilis* é positivamente correlacionada a quantidade de informação genética expressa pela proporção de alelos diferentes e pela heterozigossidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. & JAIN, S.K. Population studies in predominantly self-pollinated species; II. Analysis of quantitative genetic changes in a bulk-hybrid population of barley. Evolution, Lancaster, 16: 90-101, 1962.
- ALLARD, R.W. & KAHLER, A.L. Allozyme polymorphisms in plant populations. Stadler Genetic Symposium, St. Louis, 3: 9-24, 1971.
- ALLARD, R.W.; KAHLER, A.L. & CLEGG, M.T. Isozyme in plant population genetics. In: MARKERT, C.L., ed. Isozymes; IV. Genetics and evolution. New York, Academic Press, 1975. p. 261-72.
- ALLARD, R.W. & WORKMAN, P.L. Population studies in predominantly self-pollinated species; IV. Seasonal fluctuations in estimated values of genetic parameters in lima bean populations. Evolution, Lancaster, 17: 470-80, 1963.
- ANTONOVICS, J. Genetic variation within populations. In: DIRZO, R. & SARUKHÂN, J., ed. Perspectives on plant population ecology. Sunderland, Sinauer Associates, 1984. p. 229-40.

- ARROYO, M.T.K. Eletrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Limnanthes alba* and *Limnanthe floccosa* (Limnanthaceae). Heredity, London, 35: 153-64, 1975.
- AYALA, F.J.; POWEL, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURAU, C.A. & PEREZ-SALAS, S. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group; IV. Genic variation in natural populations of *D. willistoni*. Genetics, Princeton, 70: 113-39, 1972.
- BABEL, G.R. & SELANDER, R.K. Genetic variability in edaphically restricted and widespread plant species. Evolution, Lancaster, 28: 619-30, 1974.
- BARRIGA, J.P. Autoecologia de *Stylosanthes humilis* HBK; avaliação da variabilidade morfológica e estudos da biologia da semente. Piracicaba, 1979. 97 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BEARDMORE, J. Ecological factors and the variability of gene-pools in *Drosophila*. In: HECHT, M.K. & STEERE, W. C., ed. Essays in evolution and genetics. New York, Appleton-Century-Crofts, 1970. p. 299-314.
- BECKMAN, L. & JOHNSON, F.M. Genetic control of aminopeptidases in *Drosophila melanogaster*. Hereditas, Lund, 51:221, 1964.
- BEGG, J.E. Probable distribution of Townsville stylo as a naturalized legume in tropical Australia. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science, Sidney, 38(3): 158-62, 1972.
- BOGDAN, A.V. Tropical pasture and fodder plants; grasses and legumes. New York, Longwen, 1977. 475 p.

- BREWBAKER, J.L. & HASEGAWA, Y. Polymorphisms of the major peroxidases of maize. In: MARKERT, C.L., ed. Isozyme; III. Developmental biology. New York, Academic Press. 1975. p. 659-73.
- BREWBAKER, J.L.; UPADHYA, M.D.; MAKINEN, J. & Mac DONALD, T. Isoenzyme polymorphism in flowering plants; III. Gel electrophoretic methods and applications. Physiologia Plantarum, Lund, 21: 930-40, 1968.
- BREWER, G.J. & SING, C.F. An introduction to isozyme techniques. New York, Academic Press, 1970. 186 p.
- BROWN, A.H.D. Efficient experimental designs for the estimation of genetic parameters on plant populations. Biometrics, Washington, 31: 145-60, 1975.
- BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 52: 145-57, 1978.
- BROWN, A.H.D. Enzyme polymorphism in plant populations. Theoretical Population Biology, New York, 15: 1-42, 1979.
- BROWN, A.D.H. & ALLARD, R.W. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. Genetics, Princeton, 66: 133-45, 1970.
- BROWN, A.H.D.; MATHESON, A.C.; ELDRIDGE, K.G. Estimation of the mating system of *Eucalyptus obliqua* L'Herit. by using allozyme polymorphisms. Australian Journal of Botany, Melbourne, 23: 931-49, 1975.
- BURNS, J.M. & JOHNSON, F.M. Esterase polymorphism in the butterfly *Hemiargus isola*: stability in a variable environment. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, 68: 34-7, 1971.

- BURT, R.L. & MILLER, C.P. **Stylosanthes**; a source of pasture legumes. Tropical Grasslands, Brisbane, 9(2): 117-23, 1975.
- CAMERON, D.F. Hardseedness and seed dormancy of townsville lucerne (**Stylosanthes humilis**) selections. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, Melbourne, 7: 237-40, 1967.
- CAMERON, D.F. & IRWIN, J.A.G. Use of natural outcrossing to improve the anthracnose resistance of **Stylosanthes guianensis**. In: DSIR PLANT BREEDING SYMPOSIUM, Wellington, 1986. Anthrachnose resistance of (S. guianensis). Wellington, Agronomy Society, 1986 (special Publication, 5).
- CAVALLI, S.S. Divergência isozímica e relações evolutivas entre espécies do gênero *Relbunium* (Rubiaceae). Porto Alegre, 1976. 179 p. (Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS).
- CAVALLI-SFORZA, L.L. & EDWARDS, A.W.F. Phylogenetic analysis: models and station procedures. American Journal of Genetics, Baltimore, 19: 233-57, 1967.
- CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. Bioscience, Washington, 30(12). 814-8, 1980.
- CLEGG, M.T. & ALLARD, R.W. Patterns of genetic differentiation in the slender mild oat species *Avena barbata*. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, 69: 1820-4, 1972.
- CLEGG, M.T. & ALLARD, R.W. The genetics of electrophoretic variants in *Avena*; II. The esterase E_1 , E_2 , E_4 , E_5 , E_6 and anodal peroxidase APX_4 loci in *A. fatua*. Journal of Heredity, Washington, 64: 3-6, 1973.

- COCKERHAM, C.C: & RAWLINGS, J.O. Apparent heterosis of a neutral gene with inbreeding. Ciência e Cultura, São Paulo, 19: 89-94, 1967.
- CONDEPE/SUDENE, Recife, Zoneamento pedoclimático do Estado de Pernambuco. Recife, 1987. v. 1.
- DOBZHANSKY, T. Genetics of the evolutionary process. New York, Columbia University Press, 1970. 505 p.
- DUCKE, A. As leguminosas de Pernambuco e Paraíba. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 51: 452-5, 1953.
- DUCKE, A. Notas adicionais às leguminosas da Amazônia brasileira. Belém, Instituto Agrônômico Norte, 1959. p. 45-75. (Boletim técnico, 36).
- FALCONER, D.S. Introdução a genética quantitativa. Viçosa, Imprensa Universitária, 1981. 279 p.
- FASOULAS, A. Evolution of genetic systems. Thessaloniki, Department of Genetics and plant breeding Aristotelian University of Thessaloniki, 1974. 22 p.
- FERRERA, M.B. & COSTA, N.M.S. O gênero (Stylosanthes) Sw. no Brasil. Belo Horizonte, EPAMIG, 1979. 108 p.
- FRANKEL, O.H. Genetic resources. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, 287: 332-44, 1977.
- FYFE, J.L. & BAILEY, N.T.J. Plant breeding studies in leguminous forage crops. 1. Natural crossbreeding in winter beans. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 41: 371-78, 1951.

- GILLARD, P. & FISHER, M.J. The ecology of Townsville stylo-based pasture in Northern Australia. In: WILSON, J.R., ed. Plant relations in pastures. Melbourne, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1978. p. 340-53.
- GILLESPIE, J.H. & LANGLEY, C.H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. Genetics, Princeton, 76: 837-84, 1974.
- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 11. ed. São Paulo, Nobel, 1985. 430 p.
- GOTTLIEB, L.D. Allelic diversity in the outcrossing annual plant *Stephanomeria exigua* ssp. *carotifera* (Compositae). Evolution, Lancaster, 29: 213-25, 1975.
- GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics. Annals Missouri Garden, Davis, 64: 161-80, 1977.
- GRANT, V. Genetics of flowering plants. New York, Columbia University Press, 1975. 514 p.
- GRANT, A. & GRANT, V. Genetic and a taxonomic studies in *Gilia*; VIII. The Cobwebby *Gilias*. Aliso, Anaheim, 3:203-87, 1956.
- GURIES, R.P. & LEDIG, F.T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). Evolution, Lancaster, 36(2): 387-402, 1982.
- HAMRICK, J.L. Genetic variation and longevity. In: SOLBRIG, O.T.; JAIN, S.K.; JOHNSON, G.B.; RAVEN, P.H., ed. Topics in plant population biology. New York, Columbia University Press, 1979. p. 84-113.

- HAMRICK, J.L. & ALLARD, R.W. Microgeographical variation in allozyme frequency in *Avena barbata*. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, 69: 2100-04, 1972.
- HAMRICK, J.L. & ALLARD, R.W. Correlations between quantitative characters and enzyme genotypes in *Avena barbata*. Evolution, Lancaster, 29: 438-42, 1975.
- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Annual Review Ecological Systematics, Palo Alto, 10: 173-200, 1979.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations; I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. Genetics, Princeton, 54: 577-94, 1966.
- HUMPHREYS, L.R. Environmental adaptation of tropical pasture plants. London, Mcmillan, 1981. 261 p.
- HUNTER, R.L. & MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science, Lancaster, 125: 1294-5, 1957.
- IAA/PLANALSUCAR, Piracicaba. Caracterização edafo-climática das regiões canavieiras do Brasil; Pernambuco. Piracicaba, 1986. 78 p.
- IMAM, A.G. & ALLARD, R.W. Population studies in predominantly self-pollinated species; IV. Genetic variability between and within natural populations of wild rats from differing habitats in California. Genetics, Princeton, 51: 49-62, 1965.

- JAIN, S.K. Population structure and the effects of breeding system. In: FRANKEL, O.H. & HWAKES, J.G. ed. Crop genetic resources for today an tomorrow. Cambridge, C.U. P., 1975. p. 15-36.
- JAIN, S.K. Patterns of survival and microevolution in plant populations. In: KARLIN, S. & NEVO, E., ed. Population genetics and ecology. New York, Academic Press, 1976. p. 49-89.
- JAIN, S.K. Estimation of outcrossing rates; some alternative procedures. Crop Sciences, Madison, 19: 23-6, 1979.
- JAIN, S.K. & ALLARD, R.W. Population studies in predominantly self-pollinated species, I. Evidence for heterozygote advantage in a closed population of barley. Proceedings of the National Academy of Science. Washington, 46: 1371-7, 1960.
- JAIN, S.K. & MARSHALL, D.R. Population studies in predominantly self-pollinating species; X. Variation in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. American Naturalist, Lancaster, 101: 19-33, 1967.
- JOHNSON, G.B. Enzyme polymorphism and metabolism. Science. Lancaster, 184: 28-37, 1974.
- JOHNSON, G.B. Enzyme polymorphism and adaptation. Stadler Genetic Symposium, St. Louis, 7:91-116, 1975.
- KANNENBERG, L.W. & ALLARD, R.W. Population studies in predominantly self-pollinated species; VIII. Genetic variability in the *Festuca microstachys* complex. Evolution, Lancaster, 21: 227-40, 1967.

- KOEN, R.K. Esterase heterogeneity: dynamics of a polymorphism. Science, Lancaster, 163: 943-4, 1969.
- LEITÃO Filho, H.F. & LOVADINI, L.A.A.C. Considerações sobre o gênero (Stylosanthes) Sw. Campinas, Instituto Agrônomico, 1974. 12 p. (Boletim técnico, 10).
- LERNER, I.M. Genetic Homeostasis. Edinburgh, Oliver and Boyd, 1954. 134 p.
- LEVIN, D.A. Genetic variation in annual *Phlox*; self-compatible versus self-incompatible species. Evolution, Lancaster, 32: 245-63, 1978.
- LEVIN, D.A. Dispersal versus gene flow in plants. Annals of Missouri Botanical Garden, St. Louis, 68: 233-53, 1981.
- LEVIN, D.A. & CREPET, W.L. Genetic variation in *Lycopodium lucidulum*; a phylogenetic relic. Evolution, Lancaster, 27: 622-32, 1973.
- LEVINS, R. Evolution in changing environments. Princeton, Princeton University Press, 1968. 120 p.
- LEVINTON, J. Genetic variation in a gradient of environmental variability; marine Bivalvia (Mollusca). Science, Lancaster, 180: 75-6, 1973.
- LEWIS, H. & LEWIS, M.E. The genus *Clarkia*. University of California Publications Botany, Berkeley, 20: 241-392, 1955.
- LEWONTIN, R.C. Genetic basis of evolutionary change. New York, Columbia University Press, 1974. 346 p.

- LEWONTIN, R.C. & KRAKAUER, J. Distribution of gene frequency as a test of theory of the selective neutrality of polymorphisms. Genetics, Princeton, 74: 175-95, 1973.
- LI, C.C. Population Genetics. Chicago, University of Chicago Press, 1955. 366 p.
- MacARTHUR, R.H. Patterns of species diversity. Biology Review, Cambridge, 40: 510-33, 1965.
- MARKERT, C.L. Biology of isoenzymes. In: MARKERT, C.L., ed. Isozymes; I. Molecular structure. New York, Academic Press, 1975. p. 1-9.
- MARKERT, C.L. & MØLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenetic and species specific patterns. Biochemistry, New York, 45: 753-63, 1959.
- MARSHALL, D.R. & ALLARD, R.W. Isozyme polymorphism in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. Heredity, London, 25: 373-82, 1970.
- MARSHALL, D.R. & BROUÉ, P. Outcrossing rates in Australian populations of subterranean clover. Australian Journal of Agriculture Research, Melbourne, 24: 863-67, 1975.
- MARSHALL, D.R. & JAIN, S.K. Phenotypic plasticity of *Avena fatua* and *A. barbata*. American Naturalist, Lancaster, 102: 457-67, 1968.
- MARSHALL, D.R. & JAIN, S.K. Genetic polymorphism in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. Nature, London, 221: 276-8, 1969.
- MATHER, K. Polygenic inheritance and natural selection. Biological Reviews, Cambridge, 18: 32-64, 1943.

- MAYR, E. Populações espécies e evolução. São Paulo, Ed. Nacional, 1977. 485 p.
- Mc NAUGHTON, S.J. Natural selection at the enzyme level. The American Naturalist, Lancaster, 103: 616-24, 1974.
- MEHRA, K.L. & MAGOON, M.L. Gene centers of tropical and sub-tropical pasture legumes and their significance in plant introductions. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 12., Moscou, 1974. Proceedings. Moscou, 1976, v. 3, p. 908-13.
- MILES, J.W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of outcrossing rates in *Stylosanthes guianensis*. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 36: 259-65, 1985.
- MOHLENBROCK, R.H. A revision of the genus *Stylosanthes*. Annals of the Missouri Botanical Garden, St. Louis, 44: 299-355, 1957.
- MOLINA, S.C. Variabilidade genética em populações naturais de *Rebunium hypocarpium* (Rubiaceae). Porto Alegre, 1984. 231 p. (Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS).
- MULCAHY, D.L., ed. Gamete competition in plants and animals; proceedings. Amsterdam, North-Holland, 1975. 288 p.
- NASCIMENTO Júnior, D. Informações sobre plantas forrageiras. Viçosa, UFV, 1981. 56 p.
- NEI, M. Identity of genes and genetic distance between populations. Genetics, Princeton, 68: 47, 1971.
- NEI, M. Genetic distance between populations. American Naturalist, Lancaster, 106: 283-92, 1972.

- NEI, M. Molecular populations genetics and evolution. Amsterdam, North-Holland Publishing, 1975.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, Lancaster, 29: 1-10, 1975.
- NEI, M. & ROYCHOUDHURY, A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics, Princeton, 76: 379-90, 1974.
- NEI, M. & SAYAKUDO, M. The estimation of outcrossing in natural populations. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 33: 46-51, 1958.
- NEVO, E. & BAR, Z. Natural selection of genetic polymorphisms along climatic gradients. In: KARLING, S. & NEVO, E., ed. Populations genetics and ecology. New York, Academic Press, 1976. p. 159-84.
- PANDEY, K.H. Elements of 5 gene complex. V. Interespecific cross-compatibility relationship and theory on the evolution of the S complex. Genetics, Princeton, 40: 447-74, 1969.
- POWELL, J.R. Genetic polymorphisms in varied environments. Science, Lancaster, 174: 1035-6, 1971.
- PRAKASH, S.; LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics, Princeton, 61: 841-58, 1969.
- RASMUSSEN, D.I. Blood group polymorphisms and inbreeding in natural populations of the deer mouse *Peromyscus maniculatus*. Evolution, Lancaster, 18: 219-29, 1964.

- RICK, C.M. Natural variability in wild species of *Lycopersicon* and its bearing on tomato breeding. Genetica Agraria, Roma, 30: 249-59, 1976.
- RICK, C.M. & FOBES, J.F. Allozymes of Galagos tomatoes: polymorphism, geographic distribution, and affinities. Evolution, Lancaster, 29: 443-57, 1975.
- RICK, C.M.; FOBES, J.F.; HOLLE, M. Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*; evidence of evolutionary change in mating systems. Plant Syst. Evol., Vienna, 127: 139-70, 1977.
- RICK, C.M.; KESICKI, E.; FOBES, J.F.; HOLLE, M. Genetic and biosystematic studies on two new sibling species of *Lycopersicon* from Interandean Peru. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 47: 55-68, 1976.
- RITLAND, K. & JAIN, S.K. A model for the estimation of outcrossing and gene frequencies using n independent loci. Heredity, London, 47: 35-52, 1981.
- ROBINSON, P.J. & MEGARRITY, R.G. Characterization of *Stylosanthes* introductions by using seed protein patterns. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 26(3): 467-79, 1974.
- ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in Genetics, Austin, 7: 145-53, 1972.
- ROSALKI, S.B. Methods in the study of isoenzymes. Histochemical, London, 6: 361-8, 1974.
- RUDD, V.E. *Aeschynomene* (Benth.) Hutch. In: POLHILL, R. M. & RAVE, P.H., ed. Advances in legume systematics; part. 1 Kew, Royal Botanic Garden, 1981. p. 347-54.

- SANGHVI, L.D. Comparison of genetic and morphological methods for a study of biological differences. American Journal Phys. Anthropology, Washington, 11: 385-404, 1953.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic isozyme variations in *Zea mays*. Honolulu, 1965. 95 p. (Ph.D. - University of Hawaii).
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. Biochemical Genetic, New York, 3: 37-79, 1969.
- SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. Annual Review Plant Physiology, Stanford, 25: 225-58, 1974.
- SCANDALIOS, J.G. Genes, isozymes and evolution. In: MARKERT, C.L., ed. Isozyme; IV. Genetics and evolution. New York, Academic Press, 1975. p. 560-71.
- SCHUMAKER, K.M. & BABBEL, G.R. Patterns of allozymic simulants in ecologically central and marginal populations of *Hordeum jubatum* in Utah. Evolution, Lancaster, 34: 110-6, 1980.
- SELANDER, R.K. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*; I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). Studies in Genetics, Austin, 6: 49-90, 1971.
- SELANDER, R.K. Genetic variation in natural populations. In: AYALA, F.J., ed. Molecular evolution. Massachusetts, Sinauer Associates, 1976. p. 21-45.

- SELANDER, R.K. & KAUFMAN, D.W. Genetic variability and strategies of adaptation in animals. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, 70: 1875-7, 1975.
- SHAW, C.R. How many genes evolve? Biochemical Genetic, New York, 4: 275-83, 1970.
- SHAW, D.V. & ALLARD, R.W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. Theoretical and Applied Genetics. Berlin, 62: 113-20, 1982.
- SHAW, D.V.; KAHLER, A.L.; ALLARD, R.W. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, 78(2): 1298-302, 1981.
- SINGH, R.S. & RHOMBERG, L.R. A comprehensive study of genetic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*; II. Estimates of heterozygosity and patterns of geographic differentiation. Genetics, Princeton, 117: 255-71, 1987.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochemical Journal, London, 61: 629-40, 1955.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. Biometry. San Francisco. W.H. FREEMAN, 1969. 776 p.
- SOLBRIG, O.T. Breeding system and genetic variation in *Leavenworthia*. Evolution, Lancaster, 26: 155-60, 1972.
- SOLBRIG, O.T. Demography and natural selection. In: _____. Demograph and evolution in plant populations. Oxford, Blackwell Scientific, 1980. p. 1-20.

- STACE, H.M. Breeding systems in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an Alcohol dehydrogenase locus. Australian Journal of Agriculture Research, Melbourne, 33: 87-96, 1982.
- STACE, H.M. Genetic systems. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A. ed. The biology and agronomy of (Stylosanthes). New York, Academic Press, 1984, p. 147-159.
- STACE, H.M. & CAMERON, D.F. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. The biology and agronomy of Stylosanthes. New York, Academic Press, 1984. p.
- STEBBINS, G.L. Variation and evolution in plants. New York, Columbia University Press, 1950. 643 p.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. 2. ed. New York, McGraw-Hill, 1980. 481 p.
- STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M.; MOLL, R.H. Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population. Crop Science, Madison, 22: 737-40, 1982.
- TANKSLEY, S.D.; MEDINA-Filho, H.; RICK, C.M. The effect of isozyme selection on metric characters in an inter-specific backcross of tomato. Basis of an early screening procedure. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 60: 291-6, 1981.
- TANKSLEY, S.D.; MEDINA-Filho, H.; RICK, C.M. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an inter-specific backcross of tomato. Heredity, London, 49: 11-25, 1982.

- TANKSLEY, S.D. & RICK, C.M. Isozymic linkage map of the tomato; applications in genetics and breeding. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 57: 161-70, 1980.
- THODAY, J.M. Disruptive selection. Proceedings Royal Society London, London, B182: 109-43, 1972.
- WEBB, E.C. The nomenclature of multiple enzyme forms. Enzimologia Biologica et Clinica, Basel, 5: 124-5, 1965.
- WEIR, B.S.; ALLARD, R.W.; KAHLER, A.L. Analysis of complex allozyme polymorphisms in a barley population. Genetics, Princeton, 72: 505-23, 1972.
- WILLIAMS, R.J.; REID, R.; SCHULTZE-KRAFT, R.; COSTA, N.M.S.; THOMAS, B.D. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. The biology and agronomy of (Stylosanthes). New York, Academic Press, 1984, p. 73-99.
- WILLS, C. In defense of naive pan-selectionism. American Naturalist, Lancaster, 107: 23-34, 1973.
- WRIGHT, S. The genetic structure of populations. Annals Eugenics, London, 15: 323-54, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution, Lancaster, 19: 395-420, 1965.
- WRIGHT, S. Evolution and Genetics of populations. Chicago, University of Chicago Press, 1969. v. 2.