VARIABILIDADE ENZIMÁTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* (Willd.
ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.)

JOÃO RODRIGUES DE PAIVA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Paiva, João Rodrigues de

P149v Variabilidade enzimática em populações naturais de se-
ringueira (Hevea brasiliensis (Willd. ex Ahr. de Juss.)
Mullell. Arg.). Piracicaba, 1992.
145p. ilustr.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Eletroforese 2. Endogamia em seringueira 3. Serin-
gueira - Melhoramento 4. Seringueira - Variação genética -
Acre I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pi-
racicaba

CDD 633.895

VARIABILIDADE ENZIMÁTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* (Willd.
ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.)

JOÃO RODRIGUES DE PAIVA

Aprovado em 05.06.92

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Roland Vencovsky	ESALQ/USP
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama	ESALQ/USP
Profa. Dra. Eucléia Primo Betioli Contel	FMRP/USP
Dr. Paulo de Souza Gonçalves	EMBRAPA/IAC

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama
Orientador

Aos meus pais, Sebastião (*in memoriam*)
e Raimunda, pela lição de vida, a minha
irmã Valderina (*in memoriam*) pela pouca
oportunidade que teve na vida e aos
demais irmãos,

OFEREÇO

A Waldelice, pelo muito que
representou nesta caminhada,
ao Marcelo, a Thaís e ao Thiago,
razão maior de nossa existência,

DEDICO

A G R A D E C I M E N T O S

Trabalhos desta natureza dependem de pessoas e instituições. Muitos participaram ou influenciaram para que este fosse concluído. A todos serei sempre grato. Registro aqui os meus agradecimentos às seguintes pessoas e instituições:

Prof. Dr. Paulo Y. Kageyama pela amizade, convivência e orientação;

Prof. Dr. Roland Vencovsky pela co-orientação e desenvolvimento da metodologia genético-estatístico;

Profa. Eucléia P. B. Contel pelas sugestões no desenvolvimento da metodologia de laboratório;

Profa. Catalina R. Lopes pela cessão do programa de computador BIOSYS-1;

Dr. Paulo Gonçalves, pesquisador da EMBRAPA/IAC, pelas sugestões e facilidades concedidas na elaboração deste trabalho;

Dr. Márcio Miranda pelas sugestões e apoio nas análises de laboratório;

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela oportunidade de aperfeiçoamento;

Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto;

CENARGEN/EMBRAPA pelo apoio parcial de material de laboratório;

Universidade Federal do Acre (UFAC) e UEPAE-Rio Branco/EMBRAPA pelo apoio na coleta das sementes de seringueira;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

Núcleo de Tecnologia de Informática aplicada a Agricultura/EMBRAPA pela utilização do módulo MODLIN, do software NTIA;

Docentes e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP pelos ensinamentos concedidos e amizade;

Docentes e funcionários do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP pelos ensinamentos e amizade no trabalho. A bibliotecária Marialice Poggiani pela revisão das referências bibliográficas;

Mário Moraes e João Andrade pela revisão e sugestões na apresentação da simbologia estatística;

Edson Mori, Luiz Antônio e demais colegas de pós-graduação, pela convivência, amizade e troca de experiências;

Elza Martins pela prestimosa ajuda nas análises de laboratório. Lucia e Sueli pela convivência e amizade. Agmar pelo apoio na área de informática;

Manoel (Cleonice) Cravo pelo apoio extra tese e revisão do manuscrito.

Às demais pessoas que tornaram possíveis a realização deste trabalho, os nossos sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Gênero <i>Hevea</i>	04
2.1.1. Taxonomia.....	04
2.1.2. Caracterização Morfológica.....	06
2.1.3. Distribuição Geográfica.....	08
2.2. Melhoramento Genético da Seringueira.....	09
2.2.1. Esquema Tradicional de Pesquisa.....	13
2.2.2. Exploração da Variabilidade Natural...	16
2.2.3. Problemas Relacionados ao Melhoramento da Seringueira.....	18
2.2.4. Polimorfismo Genético em Seringueira..	21
2.3. Variabilidade Genética em Populações Naturais Através de Isoenzimas.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Coleta do Material.....	32
3.2. Análise de Eletroforese.....	35
3.2.1. Sistemas Enzimáticos.....	35
3.2.2. Preparo dos Géis.....	37
3.2.3. Preparo das Amostras.....	37
3.2.4. Condições de Corrida e Coloração dos Géis.....	39

3.2.5. Leitura dos Zimogramas.....	42
3.3. Análise Estatístico-Genética.....	43
3.3.1. Análise de Variância.....	43
3.3.2. Estimativas dos Componentes de Variância.....	44
3.3.3. Medição da Variabilidade Genética.....	48
3.3.4. Parâmetros de Diversidade Genética....	51
3.3.5 Taxa de Fertilização Cruzada através das Frequências de Heterozigotos.....	52
4. RESULTADOS.....	55
4.1. Interpretação dos Zimogramas.....	55
4.2. Parâmetros Genéticos Estimados Através da Análise de Variância.....	56
4.3. Estimativas dos Parâmetros de Variabilidade Genética.....	59
4.4. Parâmetros de Diferenciação Genética entre Populações.....	63
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. Variabilidade Genética em Populações Naturais de Seringueira.....	65
5.1.1. Sistemas Enzimáticos em Seringueira...	66
5.1.2. Variação Entre e Dentro de Populações de Seringueira.....	68
5.1.3. Frequência Alélica em Seringueira.....	76
5.2. Divergência Genética entre as Populações Naturais de Seringueira.....	79

5.3. Taxa de Cruzamento e Coeficiente de Endogamia em Seringueira.....	84
5.3.1. Taxas de Cruzamento em Seringueira....	84
5.3.2. Coeficientes de Endogamia em Seringueira.....	89
5.4. Estratégias de Melhoramento para a Seringueira	94
5.4.1. Estratégia Atual do Melhoramento Genético.....	94
5.4.2. Proposição de Estratégias de Melhoramento Genético.....	95
5.5. Estratégias de Coleta de Recursos Genéticos de Seringueira.....	101
6. CONCLUSÕES.....	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
APÊNDICE 1.....	143

VARIABILIDADE ENZIMÁTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* (Willd.)
ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.)

Autor: JOÃO RODRIGUES DE PAIVA

Orientador: PROF. DR. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

RESUMO

Com o objetivo de fazer inferências sobre a estrutura genética e quantificar a variabilidade genética entre e dentro de duas populações naturais de seringueiras (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.), através da caracterização isoenzimática, foram coletadas sementes de seringueiras nativas do Estado do Acre.

O material foi constituído de sementes coletadas de 26 e de 27 árvores matrizes, nos seringais existentes na área da EMBRAPA (UEPAE-Rio Branco) e na Reserva Florestal do Catuaba, situados nos km 14 e 22 da rodovia BR 364, respectivamente.

As análises eletroforéticas foram feitas em gel de amido com extratos frescos de folhas jovens, no estágio foliar "B" (folíolos pendentes, coloração antociânica, com cerca de 1,0cm a 2,0cm). De cada planta matriz foram analisadas 20 plantas, em média, em 4 locos enzimáticos (MDH-1, LAP-1, LAP-2 e SKDH).

Nas análises dos dados foram estimados os

parâmetros de variabilidade entre e dentro de populações, taxa de fertilização cruzada, coeficiente de endogamia, divergência genética entre populações, entre outros.

Entre as principais conclusões destacam-se as seguintes:

. Os parâmetros de variabilidade estimados demonstram altos níveis de variação genética para as duas populações de seringueira ($H_T = 0,3356$), sendo superiores à média de outras espécies arbóreas tropicais;

. O grau de variabilidade estimado nas duas populações indica que a maior porção da variabilidade total encontra-se dentro das populações (99,85%).

. Os parâmetros que medem a distância genética entre populações ($I = 0,003$, $e_2 = 0,0025$ e $D_{ST} = 0,0001$) demonstram que as duas populações são semelhantes;

. As estimativas das taxas de fertilização cruzada da seringueira nas duas populações estudadas ($\hat{t} = 64,46\%$ e $64,15\%$) indicam uma tendência para esta espécie pertencer ao grupo de plantas intermediárias, quanto ao sistema de cruzamento;

. Os resultados indicam que, nessa área, a coleta de recursos genéticos de seringueira deve ser dirigida a somente uma população dentro de cada região, com um maior número de indivíduos por população.

ENZYME VARIABILITY IN NATURAL POPULATIONS OF RUBBER

TREE (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr.

de Juss.) Müell. Arg.)

Author: JOÃO RODRIGUES DE PAIVA

Adviser: PROF. DR. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

SUMMARY

In order to infer on the genetic structure and to quantify the genetic variability between two natural populations of rubber trees (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müell.-Arg.) through isoenzymic characterization rubber tree seeds were collected in the State of Acre.

Seeds were collected from 26 and 27 mother trees in the natural region of rubber trees within EMBRAPA's (UEPAE-Rio Branco) area and the same type of region in the Reserva Florestal do Catuaba, at km 14 and 22 on BR 364 highway, respectively.

Electrophoretic analyses were carried out in starch gel with fresh leaflets extracts in the "B" leaf stage (dropping leaves, anthocyanin leaves, ranging 1.0cm to 2.0cm). Twenty plants from each mother tree on the average were analysed for 4 enzymatic loci (MDH-1, LAP-1, LAP-2, and SKDH).

Variability parameters between and within

populations, outcrossing rate, inbreeding coefficient, genetic divergence among populations, etc., were evaluated in the data analysis.

The main conclusions were as follows:

. The assessed variability parameters present high genetic variation levels for both rubber tree populations ($H_T = 0.3356$) and are superior to other average tropical tree species;

. Estimated variability degree in both populations indicate that the largest part of the total variability is found within the populations (99.85%);

. Parameters measuring the genetic distance between populations ($I = 0.003$, $\theta_2 = 0.0025$, and $D_{ST} = 0.0001$) reveal that both populations are quite similar;

. Estimates of the outcrossing rate of rubber tree in both studied populations ($\hat{t} = 64,46\%$ and $64,15\%$ indicate a tendency of that species to belong to the intermediate group of plants concerning the mating system.

. Results indicate that, in this area, collection of rubber tree germplasm should be directed to the drawing of a larger number of individuals from a single population within each region.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Hevea* é um taxon perfeitamente natural e bem definido, ou seja, facilmente reconhecido à distância. É característico da floresta tropical úmida e se distribui por 6°N e 15°S de latitude e 46°L e 77°O de longitude, cobrindo uma ampla variação de regiões ecológicas e bioclimáticas. A ocorrência natural do gênero está circunscrita aos limites da região Amazônica brasileira, onde são encontradas dez espécies, e países limítrofes, tais como Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Guiana, Suriname e Venezuela (WYCHERLEY, 1977), totalizando onze espécies.

O melhoramento genético da seringueira no Brasil tem constantemente procurado e utilizado novas fontes de variabilidade genética, visando atingir seu objetivo básico de reunir em um só indivíduo as características de alta produção de borracha e resistência ao fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx., causador da enfermidade conhecida como "mal-das-folhas".

A grande variabilidade genética natural da seringueira é uma das principais riquezas de que dispõem os melhoristas para ampliar a potencialidade de cultivo desta

espécie, principalmente nas regiões tradicionais que, apesar da tradição do cultivo da seringueira, têm excelentes condições climáticas, favoráveis ao desenvolvimento de doenças.

No entanto, o aproveitamento racional da variabilidade genética das populações naturais tem sido modesto, considerando o seu potencial, e totalmente direcionado para a obtenção de clones produtivos e resistentes às doenças. Porém, na medida em que novos conhecimentos são adquiridos sobre a forma de organização, manutenção e distribuição da variabilidade genética das espécies tropicais, fortalece-se a hipótese de que o cultivo racional de uma espécie em ambiente tropical tem que, obrigatoriamente, conviver em equilíbrio com os fatores bióticos do ecossistema, caso contrário está fadado ao insucesso. Além do mais, esses conhecimentos das populações naturais obviamente proporcionarão maior exploração do potencial de variabilidade genética existente, tanto para uso direto, pelo melhoramento genético, como para orientar a coleta, a amostragem e a preservação de germoplasma de seringueiras nativas.

Tomando-se como base as seguintes hipóteses:

- i) que o equilíbrio existente nas populações naturais de *Hevea brasiliensis* é devido ao nível de variação genética entre e dentro das populações; ii) que o conhecimento do modelo de distribuição e a quantificação da variação genética dentro da população pode ser utilizado pelo

melhoramento genético no cultivo racional da seringueira na região amazônica; e, iii) que a orientação do processo de amostragem na coleta e conservação de germoplasma pode ser obtida pela quantificação do nível de variabilidade genética existente entre e dentro das populações, pretende-se, na execução deste trabalho, alcançar os seguintes objetivos:

a) através da caracterização isoenzimática em plantas de seringueiras, oriundas de populações naturais do Estado do Acre, fazer inferências sobre a estrutura genética dessas populações;

b) através da quantificação do nível de variabilidade genética existente dentro da população, orientar o processo de amostragem na coleta e conservação de germoplasma de seringueira.

c) utilizar o modelo de distribuição da variabilidade existente nessas populações, como base para propor estratégias de melhoramento genético da seringueira, visando ao pequeno produtor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Hevea*

2.1.1. Taxonomia

O gênero *Hevea* é um taxon pertencente a família *Euphorbiaceae*, que inclui outros importantes gêneros de culturas tropicais, tais como *Ricinus* (mamona), *Manihot* (mandioca) e *Aleurites* (oiticica).

Os estudos taxonômicos são aqueles conduzidos por BALDWIN (1947), SEIBERT (1947), PIRES (1973) e SCHULTES (1977). BALDWIN (1947) fez um levantamento do material nativo da Amazônia, combinando observações citológicas, concluindo que existiam nove espécies. No Peru, SEIBERT (1947) reconheceu oito espécies. Os estudos de SCHULTES (1977) levaram-no a reconhecer nove espécies e quatro variedades e, finalmente, PIRES (1973) com o reconhecimento da *Hevea paludosa* como espécie e da descrição da *Hevea camargoana* (PIRES, 1981) considera, atualmente, a existência de onze espécies pertencentes ao gênero.

A classificação atual das espécies é baseada

nos estudos conduzidos por Bailon e Müller-Argovienisis, citado por ALBUQUERQUE (1978); por Hubber, Pax e Ducke, citados em BRASIL (1971a); e SCHULTES (1977). PIRES (1973 e 1981) e GOMES (1981) ordenaram as espécies e, atualmente, são reconhecidas no Brasil:

Hevea brasiliensis (Willd. ex A.Dr. de Juss.) Müell. Arg.

Hevea guianensis Aub.

Hevea benthamiana Müell. Arg.

Hevea nitida Mart. ex. Müell. Arg.

Hevea pauciflora (Spr. ex. Bth) Müell. Arg.

Hevea rigidifolia (Spr. ex. Bth) Müell. Arg.

Hevea camporum Ducke

Hevea spruceana (Bth.) Müell. Arg.

Hevea microphylla Ule

Hevea camargoana Pires

Hevea paludosa Ule. Jahrb.

A espécie *H. brasiliensis* é considerada a mais importante como fonte de produção de borracha, enquanto que a *H. benthamiana* apresenta resistência ao *M. ulei* e variabilidade para produção de borracha. A ~~H.~~ [?] *pauciflora* apresenta uma certa imunidade ao *M. ulei*. As espécies *H. camporum* e *H. camargoana* apresentam o caráter de porte baixo, que é considerado importante para o controle fitossanitário, porque possibilita o controle de doenças com pulverizações manuais de produtos químicos, em seringal comercial. Finalmente, a espécie *H. guianensis*,

por apresentar o caráter de folíolos ascendentes, pode ser aproveitada em trabalhos futuros de melhoramento, pois este caráter é importante na captação de energia solar (GONÇALVES et alii, 1983; VALOIS, 1983).

2.1.2. Caracterização Morfológica

A seringueira é uma espécie dicotiledônea monóica, isto é, possui flores masculinas e femininas em um mesmo indivíduo. As flores são unissexuais, pequenas, amarelas e dispostas em ráceros, na mesma inflorescência. As folhas são longamente pecioladas e repartidas em três folíolos. O fruto é uma cápsula grande, que geralmente apresenta três sementes. As sementes da seringueira possuem 45% a 50% de óleo, de cor amarelo, viscoso, secativo e cheiro forte, podendo ser aplicado na fabricação de tintas e vernizes.

Todas as espécies são lenhosas, arbóreas, no geral árvores medianas até grandes na floresta alta, com exceção da *H. camporum* e *H. camargoana*, que são arbustos de campo e *H. nitida* (var. *Toxicodendroide*), que é uma árvore de porte médio encontrada nas caatingas (campinas) quartzíticas da Colômbia, no rio Apaporis e Amazonas, e no alto rio Negro (PIRES, 1973).

Do ponto de vista econômico, a seringueira se caracteriza pela produção de látex que é formado no

interior de vasos laticíferos. Na estrutura secundária do caule, ramos e raízes, os laticíferos têm origem no floema, a partir de células de uma mesma camada de produção do câmbio. Na casca, antes da sangria, a pressão de turgência dos laticíferos está em equilíbrio com a pressão das outras células. Desse modo, a pressão do látex nas primeiras horas da manhã varia de 10 a 14 atmosferas (MORAES, 1980).

As espécies caducifólias, como a *H. brasiliensis*, entram em floração geralmente a partir de 3-4 anos de idade, após a queda das folhas. As inflorescências podem surgir nos lançamentos em alongamento antes ou depois do pleno desenvolvimento inicial das folhas. A senescência das folhas de plantas adultas ocorre no início da estação seca, na maioria dos casos. Quanto mais rápido e pronunciado o decréscimo das chuvas, mais rápida e uniforme a senescência e a queda das folhas, reduzindo-se a heterogeneidade desse caráter.

O número de cromossomos das células somáticas das principais espécies de *Hevea* foi determinado por vários pesquisadores (RAMAER, 1935; BALDWIN, 1947; PERRY, 1943; BOUHARMONT, 1960) como sendo $2n=36$. O número de cromossomos da *H. brasiliensis* foi estabelecido por PERRY (1943) como $2n=36$ e subsequente confirmado por outros autores (MENDES, 1946; MAJUNDER, 1964; ONG, 1975). Devido à ocorrência de multivalentes na metáfase I da meiose, em híbridos específicos, RAMAER (1935) postulou ser esta

espécie um anfidiplóide com número básico de $n=9$. Mais tarde BOUHARMONT (1960) confirmou que a *Hevea* tem origem anfidiplóide sendo, portanto, derivada do cruzamento de duas espécies primitivas possuidoras de genomas semelhantes, com $2n=18$.

2.1.3. Distribuição Geográfica

O gênero *Hevea* é endêmico da América do Sul, tendo ocorrência natural no Brasil e países limítrofes. Como gênero típico da hiléia amazônica, a *Hevea* apresenta muita variabilidade morfológica, com uma grande amplitude de ambientes ecológicos, variando de florestas altas à florestas arbustiva, sendo a bacia do rio Negro considerada como o centro de diversidade genética do gênero (WYCHERLEY, 1977).

A *H. guianensis* é a espécie de maior amplitude de distribuição, ocorrendo por toda a Amazônia e, por isso, é a espécie de maior variabilidade (PIRES, 1973).

Na Amazônia brasileira, a *H. brasiliensis* ocupa preferencialmente a parte ao sul do rio Amazonas, enquanto que a *H. benthamiana* distribui-se ao norte. As espécies *H. nitida*, *H. pauciflora*, *H. microphylla* e *H. rigidifolia* ocorrem em áreas distintas na bacia do rio Negro, enquanto que a *H. spruceana* é comum em baixios encharcados e sua distribuição acompanha as matas de

várzeas ou de igapós, ao longo do rio Solimões e seus afluentes. As espécies *H. camargoana* e *H. camporum* ocorrem em área de campos naturais da Ilha do Marajó e entre os rios Marmelos e Manicoré, respectivamente (BRASIL, 1971a).

A espécie *H. paludosa* é pouco conhecida e sua ocorrência foi somente registrada em áreas pantanosas, às proximidades de Iquitos no Peru (PIRES, 1973).

A falta de barreiras genéticas tem conduzido a hibridização frequente entre as espécies. Segundo MORAES (1977), isto pode ser a razão para a conhecida plasticidade ecológica, apresentada pela seringueira cultivada, que pode ser sempre aumentada através de programas de melhoramento genético.

2.2. Melhoramento Genético da Seringueira

As diferentes fases do melhoramento genético da seringueira, de certa forma, se confundem com o processo de domesticação relatado por GONÇALVES et alii (1990). Destacam estes autores, que a seringueira, ao contrário da maioria das plantas cultivadas, é uma espécie que está sendo domesticada num mundo moderno, em razão de ser uma das maiores fontes produtoras de borracha vegetal e devido à grande influência que a borracha veio a exercer sobre a civilização. Sua história é tão curta que quase não mudou seu aspecto de árvore nativa encontrada na Amazônia.

Os fatos que envolvem a domesticação da seringueira são distribuídos em seis etapas, que vão desde a sua introdução no Oriente, passando pelo aperfeiçoamento do sistema de sangria, desenvolvido por H. N. Ridley em 1898; fixação genética de plantas de alta produção de borracha, através da técnica de enxertia, descoberta em 1917; hibridação seletiva de clones superiores e propagação de clones obtidos dos híbridos superiores; descoberta e desenvolvimento da resistência ao mal-das-folhas; e, finalmente, a utilização de estimulantes químicos no painel de sangria, que proporcionam um aumento de até 25% na produção de látex (GONÇALVES et alii, 1990).

É conveniente destacar que a conjugação de todos esses fatores, além do aprimoramento da genética e do manejo da cultura, proporcionaram um aumento de produtividade de até dez vezes mais, se comparado com a produtividade dos primeiros plantios de seringueira no Oriente. Segundo IMLE (1978), até que se prove o contrário, nenhuma outra cultura teve um "record" semelhante e causou tão grande impacto na civilização, durante os primeiros 100 anos de sua domesticação, como a seringueira.

No Brasil, o insucesso do plantio da seringueira em Fordlândia e Belterra, no estado do Pará, pela Companhia Ford, determinou o início das pesquisas com o melhoramento genético da cultura, resultando na criação dos primeiros clones brasileiros.

O programa de melhoramento genético da seringueira desenvolvido pela Companhia Ford, teve por base o cruzamento entre clones produtivos e sem resistência a *M. ulei* e clones resistentes de baixa produção. Inicialmente, como fonte de resistência, foram utilizados clones primários de *H. brasiliensis* que deram origem aos primeiros cruzamentos intraespecíficos. Posteriormente, houve necessidade de se ampliarem as fontes de germoplasma resistentes de outras espécies do gênero, tais como: *H. benthamiana*, *H. spruceana*, *H. microphylla*, *H. guianensis* e *H. pauciflora* (BRASIL, 1971b).

Os híbridos oriundos dos cruzamentos de *H. brasiliensis* x *H. guianensis*, *H. brasiliensis* x *H. microphylla* e *H. brasiliensis* x *H. spruceana* foram descartados por não satisfazerem aos objetivos preconizados. Os híbridos de *H. benthamiana* (principalmente os do clone F 4542) com *H. brasiliensis*, selecionados em Fordlândia, passaram a constituir o material básico de resistência nos programas de melhoramento genético que se sucederam (VALOIS, 1978).

A partir de 1945, o programa de melhoramento genético prosseguiu em Belém (PA) sob os auspícios do Instituto Agrônomo do Norte (IAN), posteriormente, Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN) e, atualmente, Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental (CPATU), obedecendo ao seguinte esquema: seleção e

clonagem de plantas resistentes de *H. brasiliensis*; coleta de material de outras espécies de *Hevea* nos seringais da Amazônia; cruzamentos intra e interespecíficos, retrocruzamentos para o parental oriental; segundo retrocruzamento e extracruzamento também no sentido do parental produtivo. Além disso, foram intensificados os cruzamentos entre as espécies *H. brasiliensis* e *H. pauciflora* (BRASIL, 1971b).

A introdução de novo germoplasma de produção foi incrementada nesse período pela importação de clones considerados de "elites" no Oriente, por seus desempenhos, na época, de última geração.

Uma idéia da extensão do trabalho conduzido em Belterra, no período de 1942 a 1957, é dada pelo número de clones resistentes ao *M. ulei* obtidos de polinização controlada. Datam dessa época os primeiros clones da série IAN, entre os quais o IAN 717 e IAN 873 que se destacaram entre muitos outros. O número de clones produzidos nessa época excede dez mil, obtidos de 120 mil progênies de polinização controlada, testados para resistência ao *M. ulei* (TOWNSEND JUNIOR, 1961).

O melhoramento genético da seringueira foi também ampliado e intensificado em outros locais por outras instituições, principalmente, na Bahia, pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária do Leste (IPEAL), atualmente Centro de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, e, em São Paulo,

pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Na Bahia o programa iniciou, praticamente, com a avaliação dos clones amazônicos e estrangeiros, na fase inicial do fomento à cultura. Posteriormente, foi continuado com as seleções em viveiro, que deram origem aos primeiros clones da série SIAL e, em seguida, com cruzamentos controlados (GONÇALVES et alii, 1983).

No estado de São Paulo, as importações feitas pelo Instituto Agronômico de sementes híbridas dos clones Tjir 1 e Tjir 16, oriundas de jardins de sementes procedente da Companhia Firestone da Libéria, além da introdução de clones de alta produção do Oriente, permitiram a formação de seringais e o estabelecimento de coleções para a pesquisa na área de melhoramento genético (SERINGUEIRA, 1985). A viabilidade do cultivo da seringueira no estado, foram submetidos ao controle da produção e deram origem aos primeiros clones do IAC. Ao mesmo tempo, clones nacionais e estrangeiros eram introduzidos para avaliação de suas performances, tanto no planalto como no litoral paulista.

2.2.1. Esquema Tradicional de Pesquisa

Atualmente, a metodologia utilizada no desenvolvimento do programa de melhoramento genético da seringueira, consta das seguintes etapas: escolha dos

parentais; polinização controlada; estabelecimento de viveiros de cruzamentos; seleção e clonagem de plantas superiores nos viveiros de cruzamentos; avaliação e seleção de clones em experimentos de pequena escala; avaliação e seleção de clones em experimentos em grande escala (GONÇALVES et alii, 1983).

Na escolha dos parentais são observados os desempenhos dos fenótipos dos clones nos experimentos e também nos plantios comerciais, principalmente, para as características de produção de borracha e resistência a doenças. Os estudos dos parâmetros da genética biométrica, em relação aos parentais, têm auxiliado numa melhor esquematização dos programas de cruzamentos.

A técnica de polinização obedece ao seguinte esquema, conforme DIJKMAN (1951): 1. emasculação das flores masculinas nas inflorescências a serem polinizadas; 2. a coluna estaminal ou andróforo da flor masculina é inserida sobre o estigma da flor feminina; 3. a flor é vedada com uma gota de látex; e, 4. três a quatro meses após a polinização, antes do amadurecimento, o fruto é ensacado para preservar a legitimidade da semente.

A seleção conduzida nos viveiros de cruzamentos no terceiro ano de idade das plantas é baseada, principalmente, em dados preliminares de produção precoce de borracha, utilizando-se o teste Hamaker-Morris-Mann, modificado (HMM-m) por TAN & SUBRAMANIAN (1976), no vigor

das plantas, forma de esgalhamento e no grau de tolerância às das doenças.

Feita a clonagem das plantas superiores, os novos clones são avaliados em experimentos, de avaliação em pequena escala, cuja ênfase é testar maior número de clones com menor número de plantas por parcela, na mesma unidade de área. Os clones que se destacam como superiores, nos experimentos de avaliação em pequena escala. Após o segundo ano de produção podem ser recomendados para o plantio comercial em pequena escala na região onde foram avaliados e, a seguir, avaliados em experimentos em grande escala, onde a ênfase é testar menor número de clones com maior número de plantas por parcela, em vários ambientes. Além da produção são avaliados caracteres secundários que influenciam indiretamente a produção de látex, tais como: seca do painel, resistência ao vento, regeneração da casca, doença do painel de sangria, entre outros.

O tempo que se leva da polinização à recomendação final de um clone para o plantio comercial, em grande escala, é de cerca de 30 anos.

As pesquisas com o melhoramento da seringueira nos maiores Centros de Pesquisa vem buscando reduzir esse tempo, através da utilização de técnicas de indução do florescimento precoce, estudando e aprimorando os métodos de seleção precoce e redução do período de avaliação dos clones nos experimentos de avaliação em

pequena escala.

2.2.2. Exploração da Variabilidade Natural

Apesar da primeira coleta de sementes de seringueiras nativas, feita por órgão oficial de pesquisa, ter acontecido somente em 1945, a exploração da variabilidade natural data da época dos primeiros plantios, feito pela Companhia Ford, em Fordlândia e Belterra, no estado do Pará, nos anos de 1928 e 1934, respectivamente, com sementes originadas da região do rio Tapajós. Mais tarde, foram introduzidas sementes provenientes do estado do Acre, dos rios Solimões e Machado e, da região de Belém. Posteriormente, essas populações serviram de base para a seleção e clonagem de plantas produtivas e plantas resistentes e, também, para o desenvolvimento de todo o programa de melhoramento genético, iniciado em 1937, através de polinizações controladas (BRASIL, 1971b).

A ampla variabilidade genética dessas populações, permitiu a seleção de clones elites das séries F (Ford), Fx (Ford cruzamento) e IAN (Instituto Agrônomo do Norte).

Tentativas isoladas de exploração da variabilidade natural, como material de plantio, além da Companhia Ford, têm-se registrado na literatura, no distrito de Gavião Peixoto, município de Boa Esperança do

Sul-SP, no ano de 1917, com sementes procedentes do antigo Território Federal de Rondônia (CAMARGO, 1958).

Em Manaus (AM), em Belém (PA), no Estado de Mato Grosso, ao longo dos rios Madeira, no baixo Purus, Autazes, Anamã e Amazonas foram feitas pequenas plantações espontaneamente por particulares, desde da década de 30 até a década de 50, porém todos esses plantios sucumbiram por insuficiência de mão-de-obra e dificuldades outras não esclarecidas pelos autores (VELOSO, 1952; FERREIRA FILHO, 1965). Os plantios nos arredores de Belém foram os únicos submetidos à seleção fenotípica, dando origem a alguns clones primários.

Após a primeira expedição botânica à Amazônia, com o objetivo de coletar sementes de seringueira nativas, feita no município de Jarú no estado de Rondônia, em 1945, outras se sucederam, principalmente, para a coleta de hastes de matrizes de alta produção de borracha, nos Estados do Acre, Amazonas, Pará e Mato Grosso, visando a conservação de recursos genéticos e a utilização pelos programas de melhoramento genético. Desse modo, foram coletadas matrizes de alta produção das espécies *H. brasiliensis*, *H. benthamiana* e de outras espécies de interesse do melhoramento, tais como, *H. camporum*, *H. camargoana* e *H. pauciflora*, além de híbridos naturais, entre as espécies *H. brasiliensis* e *H. benthamiana* (PAIVA et alii, 1986).

Assim, o aproveitamento da variabilidade natural da seringueira vem se processando, à medida que novos materiais são coletados e incorporados aos programas de melhoramento genético, para a conservação, caracterização e a avaliação do seu potencial. Todo esse esforço da pesquisa já reúne um substancial acervo de germoplasma, que pela própria natureza do processo, funciona como fonte potencial de variabilidade genética.

2.2.3. Problemas Relacionados ao Melhoramento da Seringueira

O enfoque dado aos problemas relacionados ao melhoramento da seringueira será feito sobre dois aspectos. No primeiro a seringueira é analisada como cultura isolada e, no segundo, a seringueira é analisada como espécie participante do ecossistema tropical.

As diferenças ecológicas peculiares a cada região, onde são desenvolvidas as pesquisas com melhoramento da seringueira, e o nível de tecnologia utilizado no plantio comercial, são fatores que determinam uma abordagem diferencial dos problemas de pesquisa. Dessa maneira, os problemas podem ser reunidos em grandes grupos, como segue: baixa produtividade dos clones nacionais nas regiões com alta incidência de doenças; suscetibilidade dos clones às principais doenças; desconhecimento da estrutura

genética das populações naturais; baixa exploração do potencial de variabilidade genética existente nas espécies; e, erosão genética nas coleções de germoplasma (EMBRAPA, 1989).

Face aos problemas de baixa produtividade de borracha dos clones e a pressão de patógenos existentes, principalmente na região Amazônica e no sul da Bahia, o objetivo maior dos programas de melhoramento desenvolvidos em Manaus (AM), em Belém (PA) e na Bahia, ainda buscam associar num só clone, as características de alta produtividade e resistência a doenças. A estratégia utilizada consiste, basicamente, no cruzamento entre clones, que possuam essas características.

Apesar do esforço das instituições de pesquisa, localizadas nessas regiões, observa-se que não houve grandes mudanças no quadro de recomendações de clones para o plantio comercial (GOMES, et alii, 1983; PAIVA & GONÇALVES, 1983; PINHEIRO & ALVES, 1983). Uma análise crítica do desempenho do programa de melhoramento genético, desenvolvido em Manaus, no período de 1976 a 1984, é feita por PAIVA & GONÇALVES (1989), em seus aspectos positivos e negativos, bem como propõem um novo direcionamento do programa à luz desses conhecimentos.

Por outro lado, o nível de conhecimento dos ecossistemas tropicais tem avançado nas últimas décadas, de modo que muitas questões básicas vêm sendo esclarecidas.

Assim, BAWA (1974), demonstrou que o sistema de cruzamento entre plantas predomina nas espécies tropicais, apesar da alta proporção (68%) de espécies hermafroditas. Além disso, outros estudos têm revelado que a floresta tropical se caracteriza por apresentar grande diversidade de espécies, baixa densidade de plantas da mesma espécie por hectare, sistema predominante de polinização via animal, a distribuição geográfica das plantas do tipo agrupada, e ecossistemas apresentando grande heterogeneidade ambiental (BAWA, 1974; BAWA & OPLER, 1975; HAMRICK, 1983; KAGEYAMA, 1990). Estas características são fundamentais para que o nível de variabilidade, contida dentro das populações, tenha um significado biológico importante para o equilíbrio do ecossistema.

A propagação vegetativa da seringueira via enxertia, que é a forma normal de estabelecimento de plantios comerciais, de certa forma, condiciona os melhoristas a procurarem, tanto nas populações naturais como artificiais, as combinações gênicas ideais, reunidas em um só indivíduo, para depois fixá-las através da clonagem. Normalmente este caminho tende a uniformidade, ao contrário do que ocorre na natureza, o que pode deixar os plantios disponíveis à epidemias causadas por condicionamentos biológicos.

Portanto, a convivência harmônica entre patógeno e hospedeiro não tem sido conseguida, em plantios

comerciais, devido à estratégia que vem sendo adotada pelo melhoramento naquelas regiões. BAWA & KRUGMAN (1986) chamam a atenção para o fato de que, há mais de dez anos, já haviam enfatizado a importância dos conhecimentos, acerca dos modos de reprodução e estrutura genética de populações, no desenvolvimento de programas de melhoramento de espécies arbóreas tropicais.

2.2.4. Polimorfismo Genético em Seringueira

A técnica de eletroforese já vem sendo utilizada em seringueira pelos fisiologistas, como princípio de separação das proteínas, para a caracterização de formas enzimáticas presentes no látex (JACOB et alii, 1970; JACOB & D'AUZAC, 1972). Essa técnica também foi utilizada, para auxiliar a identificação de clones, pelo conteúdo de proteínas totais (WALUJONO & SUSENO, 1979) e pela presença ou ausência de certas enzimas (YEET et alii, 1977). Ambos os grupos de trabalho, utilizaram como material para análise o soro obtido após a coagulação do látex.

A utilização da eletroforese, torna possível a separação dos produtos dos alelos de um mesmo gene, independente do ambiente. Os indivíduos podem ser caracterizados pelos seus genótipos, composto de uma amostra de genes, tornando-se possível comparar indivíduos

ou grupos de indivíduos, à luz de características estritamente genéticas.

Desta forma, CHEVALLIER (1984) trabalhando com sementes procedentes dos estados do Acre (AC), Rondônia (RO) e Mato Grosso (MT), objetivando determinar a variabilidade genética de populações naturais de seringueiras e usando o polimorfismo de três sistemas enzimáticos (esterase I, fosfatase ácida e glutamato oxalacetato) chegou as seguintes conclusões: a) a revelação de três locos e dez alelos, permitem mostrar diferenças na diversidade genética entre os três estados; b) no geral, a variabilidade foi mais baixa e as populações mais homogêneas no Acre, em comparação com Rondônia e Mato Grosso; c) a estimativa da diversidade genética, intra e inter municípios e/ou localidade, proporcionará uma ajuda efetiva aos melhoristas, tanto na definição do esquema de seleção a ser empregado, como na definição dos locais de coletas e suas prioridades.

Os estudos preliminares, conduzidos pelos franceses, para estimar a variabilidade genética dessas populações, permitiram ainda as estimativas, apresentadas na Tabela 1.

Posteriormente, a técnica de eletroforese sendo aplicada mais amplamente, em plantas descendentes de cruzamentos controlados entre clones de seringueira, permitiu estabelecer as hipóteses de determinação genética,

TABELA 1. Parâmetros de variabilidade genética estimados em populações naturais do Acre (AC), Rondônia (RO) e Mato Grosso (MT), conforme IRCA (1985).

P A R A M E T R O S		AC	RO	MT
. Variabilidade total	-	0,290	0,311	0,451
. Variabilidade intradistrito	-	94%	73%	93%
. Variabilidade interdistrito	-	6%	27%	7%
. Alelos raros	-	41%	34%	23%

apresentadas na Tabela 2.

A partir daí, as pesquisas sobre variabilidade enzimática conduzidas pelos franceses, foram complementadas pelos seguintes estudos: a) controle genético de vários sistemas enzimáticos, usando de duas linhas suplementares de progênies; b) identificação clonal; e, c) análises de novas amostras de clones da coleção coletada em 1981, no centro de origem da espécie. Os resultados conduziram ao estudo de uma nova enzima, a isocitrato desidrogenase, provavelmente, codificada por um gene com dois alelos, além de levantar dúvidas sobre a natureza diplóide ou tetraplóide da seringueira (IRCA, 1987).

Mais recentemente, CHEVALLIER (1988) utilizou marcadores isoenzimáticos para comparar a quantidade de variabilidade genética existente nas coleções de

TABELA 2. Hipóteses de determinação genética para vários sistemas enzimáticos, conforme IRCA (1986).

ENZIMA	ESTRUTURA	Nº DE LOCOS	Nº ALELOS/ LOCO
.Endopeptidase (EC 3.4.??)	Monômero	1	3
.Esterase (EC 2.6.1.1)	Monômero	1	3
.Glutamato oxalacetato transaminase (EC 2.6.1.1)	Dímero	2:Got 1 Got 2	2 3
.Fosfatase ácida (EC 3.1.3.2)	Dímero	1	2
.Amilase (EC 3.2.1.1)	Monômero	1	2
.Leucina aminopeptida- se (EC 3.4.11.1)	Monômero	1	3
.Alanina aminopeptidase (EC 3.4.11.2)	Monômero	1	3
.Fosfoglicose isomerase (EC 5.3.1.9)	Monômero	2:PGI 1 PGI 2	2 2
.Malato desidrogenase (EC 1.1.1.37)	Dímero	2:MDH 1 MDH 2	1 2
.Alcool desidrogenase (EC 1.1.1.1)	Dímero	1	2
.Shiquimato desidroge- nase (EC 1.1.1.25)	Monômero	1	3

germoplasma coletado, em 1981, nos Estados do Acre, Rondônia e Mato Grosso, e de clones originados da coleção de Wickham (primeiras sementes de seringueira introduzidas no Oriente). Os resultados demonstraram alta variabilidade genética existente nas coleções. Foram observados, ainda, um total de 31 alelos em 10 locos e 23 alelos em 9 locos, respectivamente, para a coleção coletada em 1981 e o material de Wickham, com uma proporção de 3,1 e 2,55 de alelos por loco polimórfico. O material proveniente do Acre, Rondônia e Mato Grosso são polimórficos em 82,5%, 73,3% e 97% de seus locos, respectivamente.

A alta heterozigosidade encontrada nos clones de Wickham, em que certos locos excederam aqueles da coleção de germoplasma, demonstra que a base genética, daquela coleção, é suficiente para ser mantida por sucessivos cruzamentos e, posteriormente, fixada pela propagação assexual dos clones.

2.3. Variabilidade Genética em Populações Naturais Através de Isoenzimas

A utilização de técnicas bioquímicas para medir a variação genética em populações naturais de plantas, tal como a eletroforese, apresenta inúmeras vantagens em relação às técnicas tradicionais (ensaios genéticos de campo), que sobrepujam as desvantagens

apresentadas por esta metodologia.

Para ADAMS (1983), as isoenzimas apresentam diversas vantagens sobre os outros marcadores genéticos de herança simples, ressaltando:

1) A técnica pode ser empregada para um grande número de locos enzimáticos de um grande número de espécies;

2) A maioria das espécies estudadas tem demonstrado altos níveis de variabilidade para os locos enzimáticos conhecidos;

3) Grande número de amostras pode ser analisado ao mesmo tempo;

4) As isoenzimas expressam-se, normalmente, condominantemente e segregam em taxas mendelianas normais;

5) As isoenzimas podem ser identificadas em uma grande variedade de tecidos e em diferentes idades da planta.

Considera também vantajoso o fato das isoenzimas poderem ser utilizadas mesmo quando não se conhece o seu controle genético.

Na aplicação das técnicas tradicionais, os estudos sobre a genética básica das várias características quantitativas têm merecido pouca ênfase, além de serem de entendimento limitado e de uso restrito em estudos de genética de populações.

O padrão de variação genética de uma espécie

pode ser medido em termos que definam coletivamente a estrutura genética da espécie e, conforme BROWN (1978), essa medida inclui: a) a diversidade genética na média da população; b) os níveis de variação da diversidade em diferentes populações; e, c) a extensão e variação na correlação genética ou distância genética entre diferentes populações. Os componentes da diversidade genética, se considerados em todos os casos, incluem os tipos e números de alelos presentes, a heterozigosidade e a correlação de alelos entre locos.

Por outro lado, HAMRICK (1983) aborda o estudo da variação genética em populações naturais sob dois aspectos. No primeiro, existe a preocupação em descrever os níveis de variação genética mantidos dentro de populações ou espécies. Para abordar esta questão, os geneticistas de população têm se utilizado da técnica de eletroforese para obterem estimativas da variação genética em populações de plantas e animais. Estas estimativas são, geralmente, quantificadas em termos de número de locos polimórficos por população (P), pelo número efetivo de alelos por locos (A) e pela média do número de locos heterozigotos por indivíduo (H).

Com referência ao segundo aspecto, trata-se da problemática que envolve a conservação dos recursos genéticos, relacionada ao modo de distribuição da variação genética, tanto dentro como entre populações. Portanto,

para que seja feito um manejo adequado dos recursos genéticos, é importante que se entenda como a variação genética é distribuída, e quais as características do ambiente ou da espécie que influenciam esta distribuição.

Assim é que HAMRICK (1983) estudou a variação de aloenzimas entre e dentro de populações naturais, considerando a história vital das espécies nas seguintes fases: amplitude geográfica, modo de reprodução, sistema de cruzamento, mecanismos de dispersão de sementes e estágios de sucessão, na qual a espécie ocorre mais frequentemente. Os resultados mostram que as plantas com alta amplitude geográfica, alta fertilidade, reprodução por cruzamento, polinização pelo vento, longo tempo de vida e habitats que representam os últimos estágios da sucessão, tendem a apresentar mais variações isoenzimáticas do que espécies com outras combinações das características da história vital.

Nos estudos de HAMRICK & LOVELESS (1986) sobre a variação genética de 29 espécies de essências tropicais, em 20 sistemas enzimáticos, demonstraram que as espécies foram polimórficas para 28% de seus locos (P) apresentando, em média, 1,45 alelos por loco (A) e 2,57 alelos por loco polimórfico (Ap), sendo 11% de seus locos heterozigóticos (H).

GAN et alii (1981) estimaram a variação de isoenzimas em algumas essências de florestas tropicais da

Malásia, através dos sistemas enzimáticos da esterase, da glutamato oxalacetato transaminase e da fosfatase ácida. Os resultados mostraram um alto nível de variação genética intrapopulacional nas espécies estudadas, além de diferenças genéticas entre as classes estudadas.

A variação genética intraespecífica de isoenzimas em diversas espécies, representativas das florestas tropicais, vem sendo estudada com a finalidade de se compreender melhor a estrutura genética das espécies nesses ecossistemas. No entanto, HAMRICK & LOVELESS (1986) chamam a atenção, para a pequena quantidade de trabalhos com essências tropicais, relacionados aos níveis e distribuição da variação genética, ressaltando que a maioria dos trabalhos se concentram em espécies da floresta temperada.

BUCKLEY et alii (1988) determinaram a variação entre e dentro de duas populações de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), provenientes da região Amazônica, através de isoenzimas. Entre os principais resultados destacam-se os seguintes: a heterozigosidade média foi de 0,19, com cerca de 54,3% dos locos polimórficos; em uma população, os desvios em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para FST-2 e PGM-2, foram significativos ($F = 0,405$ e $0,443$, respectivamente), na outra população, para o loco GDH, o desvio foi altamente significativo ($F = -0,341$); a componente de diversidade

genética entre populações, representa somente 3,75% da componente de diversidade dentro da população, demonstrando que para a conservação de recursos genéticos é, mais importante, conservar maior número de plantas em uma população, do que maior número de populações.

MARCON (1988) analisou 25 populações de *Stylosanthes 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. Foram determinados e estudados 20 locos enzimáticos, sendo 15 polimórficos, pertencentes a 5 sistemas: catalase (EC 1.11.1.6), esterase (EC 3.1.1.1), leucina aminopeptidase (EC 3.4.11.1), malato desidrogenase (EC 1.1.1.37) e peroxidase (EC 1.11.1.7).

Entre as suas principais conclusões destacam-se as seguintes: o polimorfismo isoenzimático é uma função da variação ambiental; as populações do Agreste apresentam maior variabilidade em todos os níveis genéticos estudados; as duas regiões extremas, Mata e Sertão, apresentam padrões de variabilidade genética uniforme, porém distintas; a variabilidade genética é inversamente proporcional à precipitação pluviométrica anual, o que faz esta espécie ser bem adaptada ao semi-árido.

Pela análise da variação isoenzimática em amostras de 31 progênies de polinização aberta de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), originadas de populações

subespontânea do Estado da Bahia, SANTOS (1991) concluiu que a composição genética desse material contém, aproximadamente, 67% de germoplasma de Angola e 33% do Zaire. Com base nesses resultados, boas combinações híbridas são esperadas do cruzamento de palmeiras "Dura", selecionadas em material subespontâneo, com palmeiras "Tenera" ou "Pisífera" de material africano da Costa do Marfim e do Zaire.

A incorporação de novos conhecimentos na área da genética das espécies, que estão se utilizando da técnica de eletroforese, e a sua aplicação diretamente nos diferentes programas de melhoramento genético, provavelmente terão, a curto e médio prazos, uma grande evolução nos conhecimentos da genética dessas espécies, que podem, inclusive, alterar e reorientar os rumos seguidos pelo melhoramento genético.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do Material

O material utilizado neste trabalho é constituído de plântulas, oriundas de sementes de seringueiras, coletadas em duas populações naturais, localizadas no Estado do Acre.

Na escolha das populações e das árvores matrizes foram adotados os seguintes critérios:

1. As coletas de sementes foram feitas em dois seringais nativos: i) um existente na Reserva Florestal do Catuaba, situado no km-22 da rodovia BR 364, pertencente a Universidade Federal do Acre (UFAC); e, ii) outro existente na área da EMBRAPA/UEPAE-Rio Branco, localizado no km-14 da rodovia BR 364 (Figura 1);
2. As matrizes de seringueiras escolhidas para a coleta de sementes situavam-se, ao longo da estrada-de-corte do seringueiro, que normalmente parte de um ponto, com percurso bastante sinuoso e termina no ponto de origem. Na escolha das plantas foram evitadas aquelas que situavam-se contiguamente;

3. A coleta de sementes ficou restrita à área de 10-15 metros de raio da seringueira, visando assegurar a origem da semente da planta matriz;

4. O número de sementes por planta matriz variou em função da sua disponibilidade, haja vista a intensa predação por animais que as sementes são submetidas.

O seringal da Reserva do Catuaba possui três estradas-de-corte, localizadas em área de terra firme e tendo como vegetação local a floresta amazônica. As amostras de sementes (matrizes n.ºs 1 a 25) foram coletadas em uma estrada que, segundo informações do seringueiro, possui 175 "madeiras" (seringueiras), onde ele gasta 4:30h para cortá-las e 3:30h na coleta do látex. As matrizes de números 26 a 33 (Tabela 3) foram coletadas na segunda estrada deste seringal, que possui 160 "madeiras".

O seringal localizado na área da EMBRAPA possui também três estradas. A vegetação local é também a típica da floresta amazônica. Na primeira estrada que possui cerca de 160 "madeiras", na qual o seringueiro gasta 3:00h para cortá-la e 2:00h para recolher o látex, foram coletadas sementes das matrizes números 1 a 22. As amostras de números 23 a 32 (Tabela 3) foram coletadas na segunda estrada deste seringal, que possui 130 "madeiras" e dista cerca de 1 km da primeira estrada.

Todas as sementes foram postas a germinar, separadamente, por matriz, em canteiro previamente

TABELA 3. Identificação das árvores matrizes de seringueiras coletadas em dois seringais nativos no estado do Acre. Piracicaba, SP, 1992.

Reserva do Catuaba seringal 1	No. sementes	Área da EMBRAPA seringal 2	No. sementes
1	66	1	31
2	70	2	94
3	119	3	56
4	119	4	72
5	90	5	119
6	54	6	35
7	16	7	143
8	19	8	44
9	82	9	120
10	68	10	78
11	151	11	154
12	70	12	108
13	84	13	80
14	65	14	83
15	54	15	142
16	126	16	32
17	132	17	117
18	47	18	67
19	57	19	133
20	148	20	157
21	56	21	30
22	124	22	60
23	60	23	55
24	43	24	115
25	115	25	41
26	61	26	107
27	125	27	136

TABELA 3. Identificação das árvores matrizes de seringueiras coletadas em dois seringais nativos no estado do Acre. Piracicaba, SP, 1992.

Reserva do Catuaba seringal 1	Nº. semen tes	Área da EMBRAPA seringal 2	Nº. semen tes
28	82	28	59
29	118	29	68
30	71	30	150
31	21	31	125
32	35	32	104
33	24	-	-
t o t a l	2.572	t o t a l	2.915

preparado no viveiro do Departamento de Ciências Florestais (DCF), da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" (ESALQ). Posteriormente, foi feita a repicagem das plântulas para sacos de polietileno, sendo repicadas o máximo de 30 plântulas por matriz, quando a germinação foi superior a 30 sementes, e todas as mudas das matrizes quando o número inferior a 30 sementes germinadas.

As análises eletroforéticas foram feitas com extrato de folhas das plântulas com cinco meses de idade.

3.2. Análise de Eletroforese

3.2.1. Sistemas Enzimáticos

A escolha dos sistemas enzimáticos para a análise genética do material em laboratório foi precedida por uma série de testes, visando adaptar a metodologia descrita por LEBRUN & CHEVALLIER (1988) às condições do Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva do DCF/ESALQ. Estes testes tiveram o objetivo de fornecer as informações que possibilitassem escolher os sistemas enzimáticos que apresentassem boa resolução com o máximo de informações.

Desta forma, foram testados os seguintes sistemas: álcool desidrogenase (ADH) - EC 1.1.1.1., 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGD) - EC 1.1.1.44., fosfoglicomutase (PGM) - EC 5.4.2.2, fosfoglicose isomerase (PGI) - EC 5.3.1.9, e isocitrato desidrogenase (ICD) EC - 1.1.1.42. Porém, nenhum destes sistemas foi aproveitado nas análises, apesar de todos terem apresentado pelo menos alguma atividade, isto porque não tiveram uma resolução e nitidez suficiente que permitissem uma análise segura, a nível populacional.

Com base nesses testes iniciais, os sistemas enzimáticos que apresentaram boa resolução e foram utilizados para as análises das plantas foram os seguintes: malato desidrogenase (MDH) - EC 1.1.1.37, shiquimato desidrogenase (SKDH) - EC 1.1.1.25 e leucina aminopeptidase (LAP) - EC 3.4.11.1.

3.2.2. Preparo dos Géis

As análises eletroforéticas dos três sistemas enzimáticos foram feitas em gel de amido, com migração horizontal.

No preparo do gel foi obedecida a seguinte sequência: i) pesagem do amido a 12% da marca "Sigma"; ii) adicionou-se 10% do tampão do gel (histidina a 0,05 M pH 6) para um volume de 208ml da solução; iii) a solução foi posta em kitasato e levada ao fogo, sob agitação constante em agitador mecânico, durante aproximadamente 15 minutos, até a solução ficar translúcida; iv) em seguida foi feita a desaeração e colocada em fôrma de vidro temperado, previamente montada nas dimensões de 20cm x 13cm x 0,8cm, com fita adesiva.

Normalmente o gel foi preparado no dia anterior à corrida e guardado em câmara fria a 4°C, devidamente protegido contra o ressecamento por uma folha de polietileno.

3.2.3 Preparo das Amostras

O material utilizado nas análises de eletroforese constou de extrato fresco de folhas jovens de plântulas de seringueira.

No dia da corrida eletroforética, pela parte

da manhã, as folhas no estágio foliar "B" (folíolos pendentes, coloração antociânica, com cerca de 1,0cm a 2,0cm) foram coletadas, identificadas separadamente por planta e conservadas à baixa temperatura (conforme recomendação de LEBRUN & CHEVALLIER (1988), em seguida foram levadas para o laboratório. Para cada corrida foram coletados 20 folíolos de 20 plantas diferentes, que se apresentavam no estágio foliar adequado às análises.

Os homogeneizados de cada amostra foram obtidos pela maceração dos folíolos, com o auxílio de um bastão de vidro, de extremidade esmerilhada, sobre placas de porcelana com escavações arredondadas e devidamente resfriada. Para tanto, colocava-se a placa de porcelana num pequeno recipiente de plástico, contendo água até a borda da placa e, em seguida, deixava-a no congelador até o congelamento da água. Normalmente este procedimento era feito no dia anterior ao da corrida.

Cada amostra era macerada em solução contendo duas gotas do tampão de extração (tris a 0,07 M mais cisteína 0,01 M e pH de 7,2-7,5), uma gota de ácido ascórbico a 1%, 20mg de polivinil pirrolidona (PVP) e 20mg de areia lavada (areia peneirada, lavada com ácido sulfúrico e livre de limalhas de ferro), esta visando facilitar a maceração.

Os extratos de cada amostra foram absorvidos em pedaços de papel (papel whatman nº 3 com dimensões de

5mm x 9mm), que, após a retirada do excesso de solução, eram colocados lado a lado no gel de amido. Em cada gel foram colocadas 20 amostras de plantas e, no meio do gel, dividindo em dois grupos de 10 amostras, colocava-se um papel com solução de azul de bromofenol a 0,1%, para marcar a linha de frente durante a migração.

3.2.4. Condições de Corrida e Coloração dos Géis

Após a aplicação das amostras, os géis foram colocados para migrar em cubas horizontais próprias, mantidas durante a corrida em geladeira à temperatura de 4°C. Por sobre o gel colocou-se ainda uma placa de vidro e sobre esta um recipiente contendo gelo.

O tampão da cuba utilizado foi o Tris mais ácido cítrico pH 6,6 (Tabela 4), descrito por LEBRUN & CHEVALLIER (1988).

No início da corrida, a corrente foi regulada para 20 miliampere (mA) constante, com voltagem em 120 volts (V). Após 45 minutos de corrida, os papeis contendo os extratos eram retirados. Depois de duas horas de corrida a voltagem era regulada para 200 V constante até o final da corrida, com a corrente em 30 mA. Nestas condições o potencial elétrico que passava pelo gel era de 3-6 V/cm.

O tempo de corrida usando desse procedimento era de 5 horas, quando o "front" (pedaço de papel com o

marcador azul de bromofenol a 0,1%) atingia 10-11cm e a migração das bandas mais rápidas alcançavam cerca de 4-6cm nos três sistemas estudados (MDH, LAP e SKDH).

Terminada a corrida, os géis eram cortados com fio de nylon em quatro fatias com 2cm de espessura cada. A primeira fatia era desprezada, na segunda era feita coloração para a malato desidrogenase (MDH), na terceira para a shiquimato desidrogenase (SKDH) e na quarta para a leucina aminopeptidase (LAP).

Na coloração dos sistemas enzimáticos foram utilizados os seguintes protocolos:

. MDH

. Tampão: Tris HCl 0,05M pH 8,5	- 10 ml
. DL malato 1 M pH 7	- 5 ml
. NAD ⁺ (10mg/ml)	- 1 ml
. NBT (10mg/ml)	- 1 ml
. PMS (10mg/ml)	- 1 ml
. Água destilada	- 50 ml

. SKDH

. Tampão: Tris HCl 0,05M pH 8,5	- 10 ml
. Ácido shikimico	- 80 mg
. NADP ⁺ (5mg/ml)	- 1 ml
. MgCl ₂ 0,4 M (81,2mg/ml)	- 1 ml
. NBT (10mg/ml)	- 1 ml
. PMS (1mg/ml)	- 1 ml
. Água destilada	- 50 ml

TABELA 4. Sistema enzimáticos, abreviações, tampões, aloenzimas e mobilidade relativa (RM) em análise eletroforética para 2 populações naturais de seringueira. Piracicaba. SP, 1991.

ENZIMA	ABREVI AÇÕES	T A M P Õ E S*			ALOENZIMA	RM
		ELETRODO	GEL	COLORAÇÃO		
.Malato desidrogenase EC 1.1.1.37	MDH-1	A	B	C	1	100
					2	90
					3	80
.Shiquimato desidrogenase EC 1.1.1.25	SKDH	A	B	C	1	100
					2	115
					3	98
					4	76
					5	56
.Leucina aminopeptidase EC 3.4.11.1	LAP-1	A	B	D	1	100
					2	107
					3	116
					4	93
					5	87
	LAP-2	A	B	D	1	100
					2	113
					3	91
					4	76

* - A : Tris citrato pH 6,6; B: Histidine 0,05M pH 6,0; C; Tris HCl pH 8,5 e D: Tris Maleato pH 5,4 (LEBRUN & CHEVALLIER, 1988).

.LAP

- . Tampão: Tris Maleato 0,1M pH 5,4 - 20 ml
- . L-leucil β -naftilamida (250mg/100ml de H₂O) - 10 ml
- . Fast Black K Salt - 20 mg
- . Água destilada - 50 ml

Para os sistemas MDH e LAP os géis eram mantidos na solução de revelação por 30 minutos a 40°C, enquanto que para o SKDH permaneceu por duas horas.

Após a revelação, os géis eram lavados e fixados em solução de glicerina a 10% por 2-3 horas; em seguida eram transferidos para a solução de transparentização (65% de metanol e 0,5% de glicerina).

3.2.5. Leitura dos Zimogramas

Antes da fixação dos géis, foram feitas as leituras dos zimogramas, que consistiu em se colocar o gel sobre uma placa de vidro, enxugá-lo bem e cobri-lo com uma folha de polietileno transparente, que permitia desenhar as bandas na folha em suas reais dimensões de migração.

Posteriormente, foram calculados os RM's (migração relativa) de cada variante enzimática, de acordo com o seu respectivo loco, conforme recomendação de CHELIAK & PITEL (1984) em estudos de espécies florestais (Tabela 4). A comparação da distância de migração das variantes foi feita em relação à distância de migração da banda padrão. A

banda padrão de cada loco estudado foi aquela com maior frequência, constância e nitidez nos géis.

3.3. Análise Estatístico-Genética

3.3.1. Análise de Variância

Para cada alelo identificado foi feita uma análise de variância, conforme proposto por WEIR (1990). Para tanto, foi utilizada a notação recomendada por este autor, onde a variável x_{il} corresponde ao gene "l" na amostra da população "i", sendo que quando x_{il} estiver presente recebe o valor "1" (um) e se estiver ausente o valor "0" (zero). Desta forma, as análises foram feitas obedecendo ao modelo hierárquico desbalanceado e com três níveis de hierarquia, ou:

$$X_{ijkl} = \mu + p_i + f_{j(i)} + b_{k(i,j)} + g_{l(ijk)}$$

onde tem-se:

- X_{ijkl} : frequência do gene l, dentro do indivíduo k, da família j, pertencentes a população i;
- μ : média geral;
- p_i : efeito da população i ($i = 1, 2, \dots, a$);
- $f_{j(i)}$: efeito da família j dentro da população i ($j = 1, 2, \dots, b_i$);

$b_{k(i,j)}$: efeito do indivíduo k dentro da família j e da população i ($k = 1, 2, \dots, c_{ij}$);

$g_{l(i,j,k)}$: efeito do gene l dentro do indivíduo k , dentro da família j e da população i ($l = 1, 2, \dots, n_{ijk}$).

As fontes de variação e as esperanças dos quadrados médios, utilizando-se do modelo hierárquico, são representadas na Tabela 5.

3.3.2. Estimativas dos Componentes de Variância

Nas estimativas dos componentes de variância foi seguido a metodologia apresentada por WEIR (1990) que, pelo desdobramento dos quadrados médios apresentado na Tabela 5, foram estimados como segue:

$$\hat{\sigma}_G^2 = QM_G$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = (QM_I - QM_G) / 2$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = (QM_F - QM_I) / K_1$$

$$\hat{\sigma}_P^2 = [QM_P - (QM_I - K_2 \hat{\sigma}_F^2)] / K_3$$

onde:

K_1 , K_2 e K_3 : correspondem aos coeficientes das variâncias entre famílias ($\hat{\sigma}_F^2$) e populações ($\hat{\sigma}_P^2$) no modelo hierárquico desbalanceado.

TABELA 5. Esperanças matemáticas dos quadrados médios $[\xi(QM)]$ para populações (P), famílias dentro de população (F/P), indivíduos dentro de famílias e população (I/F/P), e genes dentro de indivíduo, família e população (G/I/F/P) obtidas das análises de variância no modelo hierárquico desbalanceado, conforme ANDERSON & BANCROFT (1952) e WEIR (1990). Piracicaba, SP, 1991.

FV	GL	SQ^1	QM^1	$\xi(QM)^1$
Populações	$a - 1$	SQ_P	QM_P	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2 + K_2\sigma_F^2 + K_3\sigma_P^2$
Famílias	$\sum_{i=1}^a b_i - a$	SQ_F	QM_F	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2 + K_1\sigma_F^2$
Indivíduos	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} C_{ij} - \sum_{i=1}^a b_i$	SQ_I	QM_I	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2$
Genes	$n \dots - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} C_{ij}$	SQ_G	QM_G	σ_G^2
Total	$n - 1$			

¹ - Vide apêndice para estimar os parâmetros

O significado genético dos componentes de variâncias são apresentados a seguir:

$$\hat{\sigma}_G^2 = q(1 - q)(1 - \hat{F})$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = q(1 - q)(\hat{F} - \hat{\theta}_1)$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = q(1 - q)(\hat{\theta}_1 - \hat{\theta}_2)$$

$$\hat{\sigma}_P^2 = q(1 - q)(\hat{\theta}_2)$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_P^2 = q(1 - q)$$

onde :

q : frequência de um gene em um determinado loco;

$\hat{F}$: coeficiente médio de endogamia de todas as plantas nas populações analisadas, a nível de espécie;

$\hat{\theta}_1$: coeficiente de parentesco das plantas dentro das famílias;

$\hat{\theta}_2$: medida de distância genética (coeficiente de Cockerham) entre as populações analisadas. Corresponde também ao parentesco entre as plantas de famílias diferentes dentro das populações;

$\hat{\sigma}_G^2$: variância entre genes;

$\hat{\sigma}_I^2$: variância entre indivíduos;

$\hat{\sigma}_F^2$: variância entre famílias;

$\hat{\sigma}_P^2$: variância entre populações;

$\hat{\sigma}_T^2$: variância total, que corresponde a somatória das demais variâncias.

Os coeficientes médio de endogamia de todas as plantas nas duas populações ($\hat{F}$) e de endogamia dentro das populações ($\hat{f}$) foram estimados através das seguintes expressões:

$$\hat{F} = (\sigma_T^2 - \sigma_G^2) / \sigma_T^2$$

$$\hat{f} = (\hat{F} - \hat{\theta}_2) / (1 - \hat{\theta}_2)$$

A taxa de fertilização cruzada da espécie foi estimada para cada alelo utilizando-se da expressão a seguir, conforme WEIR (1990):

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

As estimativas médias dos parâmetros $\hat{F}$, $\hat{\theta}_1$, $\hat{\theta}_2$, $\hat{f}$ e $\hat{t}$, considerando todos os alelos de cada um dos locos separadamente e todos os locos simultaneamente, foram obtidos através da média dos quadrados médios individuais, ponderados pelos graus de liberdade:

$$\overline{QM}_P = (SQ_{P1} + SQ_{P2} + \dots + SQ_{Pn}) / (Gl_1 + Gl_2 + \dots + Gl_n)$$

$$\overline{QM}_P = (\sum SQ_P) / (\sum Gl_n)$$

sendo:

$\overline{QM}_P$: média dos quadrados médios entre populações para

todos os alelos analisados;

SQ_{P_1} : soma de quadrados entre populações para o alelo 1;

Gl_1 : graus de liberdade entre populações para o alelo 1.

3.3.3. Medição da Variabilidade Genética

Na análise dos dados de eletroforese ao nível das populações, com perda da estrutura de famílias por população, foi utilizado o programa de computador BIOSYS-1 (SWOFFORD, 1989) que fornece estimativas das frequências alélicas e medida de variabilidade genética, além de testar os desvios das frequências genotípicas em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, calcular os F 's estatístico de WRIGHT (1978), testar a heterogeneidade entre frequência observada e esperada dos alelos nas populações e o cálculo da distância de NEI (1972) entre populações.

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

A : número médio de alelos por loco;

P : proporção de locos polimórficos por população;

$\bar{H}$: diversidade gênica (heterozigosidade média).

O número médio de alelos por loco foi obtido pela contagem direta dos alelos presentes na população ponderado pelo número de locos. Um loco era considerado

polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassava a 0,95.

A heterozigozidade em um determinado loco era calculado diretamente da amostra (BROWN & WEIR, 1983):

$$\hat{H} = 1 - \sum_i \hat{P}_{ii}$$

sendo $\hat{P}_{ii}$ a frequência de homozigotos para o i-ésimo alelo.

A heterozigosidade média ($\bar{H}$) foi considerada como a média desses valores, em relação ao total de locos analisados (NEI, 1975).

Com base nas frequências observadas ($\hat{H}_o$) e esperadas ($\hat{H}_e$) de heterozigotos, foi calculado o índice de fixação ($\hat{I}_F$), que é definido como o total de heterozigose observado em relação a heterozigose esperada em cruzamentos ao acaso (WRIGHT, 1965):

$$\hat{I}_F = 1 - (\hat{H}_o / \hat{H}_e)$$

Para testar os desvios das frequências genotípicas em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, através do teste qui-quadrado, foram utilizadas três classes genotípicas: A - número de homozigotos para o alelo mais comum; B - número de heterozigotos entre os alelos comuns e os raros; e C - número de homozigotos dos alelos

raros e os demais heterozigotos.

A distância genética entre as duas populações foi também medida pelo índice de identidade gênica de NEI (1972), que se baseia nas frequências alélicas de locos homólogos.

Assim, considerando as populações X e Y, com frequência x_i e y_i do i-ésimo alelo em X e Y, respectivamente, a probabilidade de dois genes escolhidos ao acaso é $jX = \sum x_i^2$ para a população X e $jY = \sum y_i^2$ para a 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:

$$I = JXY / \sqrt{JX \cdot JY}$$

onde JX, JY e JXY correspondem às 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 eram iguais nas duas populações, e $I = 0$ quando as duas populações não tinham alelos em comum.

A distância genética (D) entre duas populações foi considerada como sendo o logaritmo negativo da identidade genética entre elas, ou seja: $D = - \ln I$.

3.3.4. Parâmetros de Diversidade Genética

A diversidade genética medida pelos parâmetros de NEI (1973) foram estimados da seguinte maneira:

$$\hat{H}_T = 1 - \sum \bar{p}_u^2$$

onde:

$\hat{H}_T$ = diversidade genética total para cada loco polimórfico;

$\bar{p}_u$ = frequência média do u-ésimo alelo no dado loco.

A diversidade genética entre e dentro de populações foram estimadas a partir da diversidade genética total:

$$\hat{H}_T = \hat{H}_S + \hat{D}_{ST}$$

sendo:

$\hat{H}_S$ = diversidade genética dentro de subpopulações;

$\hat{D}_{ST} = \hat{H}_T - \hat{H}_S$ = diversidade entre populações.

A proporção da diversidade genética devido ao componente entre populações ($\hat{G}_{ST}$) foi estimado em função da diversidade total:

$$\hat{G}_{ST} = \hat{D}_{ST} / \hat{H}_T$$

A diversidade genética entre populações, medida pelos parâmetros de WRIGHT (1965), comumente denominado de ^{estatística de F} (F-estatístico), baseou-se na fórmula geral:

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

onde:

$\hat{F}_{ST}$, $\hat{F}_{IS}$ e $\hat{F}_{IT}$: correspondem aos índices de fixação dos alelos por loco, de dentro da população e para a população, respectivamente.

3.3.5. Taxa de Fertilização Cruzada através das Frequências de Heterozigotos

Os coeficientes de endogamia dentro das populações, ao nível de populações de espécie, estimados a partir das frequências esperadas ($\hat{H}_e$) e observadas ($\hat{H}_o$) de heterozigotos, conforme LI (1955) e WEIR (1990), foram calculados pela expressão:

$$\hat{f} = (\hat{H}_e - \hat{H}_o) / \hat{H}_e$$

onde:

$\hat{H}_e = 1 - \sum p_u^2$, sendo p_u^2 a frequência esperada de

homozigotos para o alelo "u";

$\hat{H}_o = 1 - \sum P_{uu}$, sendo P_{uu} a frequência observada de homozigotos para o alelo "u".

Para estimar a taxa de fertilização cruzada foi utilizada a expressão, citada anteriormente, onde o valor de "t" foi calculado da seguinte maneira:

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

As estimativas do erro do coeficiente de endogamia e da taxa de fertilização cruzada, calculadas a partir das frequências esperadas e observadas de heterozigotos, foram calculadas utilizando-se as seguintes expressões

$$\text{Var}(\hat{t}) = \frac{4}{(1 + f)^4} [\text{Var}(\hat{f})]; \text{ conforme WEIR (1990);}$$

$$\text{Var}(\hat{f}) = \frac{1}{nH_o^4} \left\{ 2H_o^2 \left[\sum_u p_u^2 (p_u + P_{uu}) + \sum_{u < v} p_u p_v P_{uv} \right] - \right. \\ \left. 4H_o H_o \sum_u p_u P_{uu} \right) - (2H_o - H_o H_o - H_o)^2 + H_o^2 (1 - H_o) \Big\};$$

conforme, VENCOVSKY (1992^{*}); onde,

* - VENCOVSKY, R. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba SP) Comunicação pessoal, 1992.

$\text{Var}(\hat{f})$ - variância do coeficiente de endogamia;

n - número de plantas analisadas;

$\hat{H}_e$ - frequência esperada de heterozigotos na população;

$\hat{H}_o$ - frequência observada de heterozigotos na população;

$\hat{p}_u$ - frequência esperada de homozigotos para o alelo "u";

$\hat{P}_{uu}$ - frequência observada de homozigotos para o alelo "u";

$\hat{p}_v$ - frequência esperada de heterozigotos para o alelo "v";

$\hat{P}_{uv}$ - frequência observada de heterozigotos para os alelos "u" e "v".

4. RESULTADOS

4.1. Interpretação dos Zimogramas

Na interpretação de variantes de aloenzimas é necessário caracterizá-las visando registrar e marcar sua ocorrência consistentemente. Existem diversas maneiras pelas quais isto pode ser feito. Normalmente, na maioria dos estudos com essências florestais, o número de locos isoenzimáticos tem sido contado sequencialmente do ânodo para o cátodo, para os sistemas de múltiplos locos.

As variantes de aloenzimas são caracterizadas de acordo com o seu loco e, para tanto, é considerada a distância de migração de uma variante padrão. A distância de migração da aloenzima mais comum dentro de um loco é medida e comparada com a distância total que a frente do tampão migrou. Quaisquer variantes em relação a este padrão são identificados como alelos pertencentes ao mesmo loco.

Desse modo, a Figura 2 ilustra esquematicamente, os padrões eletroforéticos que apresentaram boa atividade e cujos locos foram determinados para cada um dos três sistemas estudados.

No sistema leucina aminopeptidase (LAP) foram identificados dois locos (LAP-1 e LAP-2). No LAP-1 foram identificados cinco alelos que, por convenção, denominou-se de alelo 1 para o mais comum, alelos 2 e 3 para aqueles que apresentaram RM's (migração relativa) superiores a 1, respectivamente, e alelos 4 e 5 para aqueles que apresentaram RM's inferiores a 1 (Figura 3).

No loco LAP-2, de migração mais lenta, foram identificados quatro alelos, com o alelo 2 apresentando RM superior a 1 e os demais, valores inferiores.

No sistema shiquimato desidrogenase (SKDH) foi identificado somente um loco com cinco alelos. O alelo 2 apresentou RM superior a 1 (Figura 4).

O sistema malato desidrogenase (MDH) apresentou um padrão de bandas de difícil interpretação de todos os seus locos, nas condições de análise do material trabalhado. Neste sistema, foi identificado e analisado o loco mais rápido, apresentando três alelos. O alelo 3, mais lento, se sobrepôs ao alelo mais rápido de um outro possível loco (Figura 5).

4.2. Parâmetros Genéticos Estimados através da Análise de variância

Nas Tabelas 6, 7, 8 e 9 são apresentados os quadrados médios para dezessete alelos dos locos LAP-1,

LAP-2, SKDH e MDH-1, respectivamente com 5, 4, 5 e 3 alelos, obtidos pela análise de variância da frequência gênica entre indivíduos, obedecendo ao modelo hierárquico desbalanceado, com estruturação de populações, famílias/população, indivíduo/família/população e genes/indivíduo/família/população.

Através da manipulação algébrica dos quadrados médios, obtém-se as estimativas das variâncias entre populações, entre famílias/população, entre indivíduos/família/população e entre genes/indivíduo/família/população que, por meio destas, permitiram o cálculo dos demais parâmetros.

Na Tabela 10 são apresentadas as estimativas de variância entre populações ($\hat{\sigma}_P^2$), entre famílias/população ($\hat{\sigma}_F^2$), entre indivíduos/família/população ($\hat{\sigma}_I^2$), entre genes/indivíduo/família/população ($\hat{\sigma}_G^2$) e da variância total ($\hat{\sigma}_T^2$) para os dezessete alelos nos quatro locos identificados para seringueira.

A $\hat{\sigma}_P^2$ manteve níveis médios baixos por loco, que variou de $9,2 \cdot 10^{-7}$ para o alelo 2 do LAP-2 a 0,1089 para o alelo 1 também do LAP-2. Para a $\hat{\sigma}_F^2$ os valores estimados para o alelo 1 em todos os locos foram superiores aos demais. Os valores médios por loco foram superiores para o SKDH, seguido do LAP-1, LAP-2 e MDH-1. A $\hat{\sigma}_I^2$ apresentou o valor 0 (zero) para a média dos alelos do LAP-1 e valores que variaram entre $2,5 \cdot 10^{-7}$ a 0,0426 para

os demais alelos. Os valores estimados da $\hat{\sigma}_o^2$ apresentaram-se relativamente superiores aos valores das demais variâncias para todos os alelos, enquanto que para a média dos locos foi superior para o SKDH, seguido do LAP-1, LAP-2 e MDH-1. Os valores médios da $\hat{\sigma}_T^2$ por loco variaram de 0,0213 para o MDH-1 a 0,1250 para o SKDH, sendo que para a média dos dezessete alelos o valor foi de 0,0697.

Os valores apresentados na Tabela 11 correspondem às estimativas dos coeficientes de endogamia médio de todas as plantas nas duas populações ($\hat{F}$) e dentro das populações ($\hat{f}$), do parentesco dentro das famílias ($\hat{\theta}_1$), da distância genética entre populações ($\hat{\theta}_2$) e da taxa de fertilização cruzada ($\hat{t}$), para os dezesseis alelos e suas respectivas médias por loco.

Os valores de $\hat{F}$ e $\hat{f}$ para todos os alelos nos quatro locos foram semelhantes, inclusive com médias iguais para os locos LAP-1 e LAP-2 (0,1664 e 0,2099, respectivamente), com exceção do loco MDH-1 que apresentou os valores de 0,2535 e 0,2161 para $\hat{F}$ e $\hat{f}$, respectivamente.

O coeficiente de parentesco entre plantas, dentro de famílias, foi superior para a média do loco LAP-1 (0,1664) em relação aos demais que apresentaram os seguintes valores médios por loco: LAP-2 = 0,1444; SKDH = 0,0976 e MDH-1 = 0,1080. A média geral para os dezessete alelos foi de 0,1270, próximo ao valor esperado para famílias de meios irmãos (0,125). Convém ressaltar que era

esperado um valor maior de $\hat{\theta}_1$, considerando que a taxa de fertilização cruzada foi inferior a 100% nas populações estudadas.

A maioria dos coeficientes estimados de distância genética entre as duas populações apresentou valores negativos e próximos de zero. Os valores médios por loco foram os seguintes: LAP-1 = 0; LAP-2 = - 0,0001; SKDH = - 0,0008 e MDH-1 = 0,0531, e a média dos dezessete alelos foi de 0,0025, demonstrando haver muita semelhança genética entre as populações.

A taxa de fertilização cruzada variou de 42,8% a 100,4% entre os alelos. A taxa média por loco foi de 71,5% para o LAP-1, de 65,3% para o LAP-2, de 60,1% para o SKDH e de 65,0% para o MDH-1. A taxa média geral entre todos os alelos foi de 64,5%.

4.3. Estimativas dos Parâmetros de Variabilidade Genética

As frequências dos dezessete alelos nas duas populações estudadas são apresentadas na Tabela 12. Observa-se que no loco LAP-1 o alelo mais frequente atingiu 79,7% e 85,3%, respectivamente para as populações 1 e 2, enquanto que para o LAP-2 o alelo mais frequente alcançou 89,4% na população 1 e 85,7% na população 2.

As frequências dos cinco alelos do loco SKDH,

nas duas populações, foram mais bem distribuídas em relação aos demais locos. A média do alelo mais frequente nas duas populações foi de 53,7%. Para o loco MDH-1 o alelo mais frequente atingiu 93,3% na população 1 e 100% na população 2, na análise de 469 e 519 plantas, respectivamente.

Na Tabela 13 são apresentadas as medidas de variabilidade genética para as duas populações de seringueira, representadas pelo tamanho médio da amostra/loco ($\bar{N}$), pelo número médio de alelos/loco (A), pela proporção de locos polimórficos (P) e pelas heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e).

O tamanho médio da amostra/loco na população 1 foi de 465,0 e na população 2 foi de 487,8 indivíduos analisados, enquanto que o número médio de alelos/loco foi de 4,0 e 4,3 para a população 1 e 2, respectivamente. A proporção de locos polimórficos, usando como critério de que um loco é considerado polimórfico, quando a frequência do alelo mais comum não exceder a 0,95, foi de 100% para a população 1 e 75% para a população 2, na análise dos quatro locos dos três sistemas enzimáticos analisados.

As heterozigosidades médias observadas foram de 0,252 ($\pm 0,085$) e 0,229 ($\pm 0,092$), respectivamente para as populações 1 e 2, enquanto que as esperadas foram de 0,319 ($\pm 0,105$) e 0,295 ($\pm 0,130$).

Na Tabela 14 são apresentadas as frequências observadas ($\hat{H}_o$) e esperadas ($\hat{H}_e$) de heterozigotos, e o

índice de fixação ($\hat{I}_F$), para cada loco por população.

As frequências observadas de heterozigotos ($\hat{H}_o$), para cada loco na população 1, variaram de 0,100 (MDH-1) a 0,470 (SKDH), enquanto que para a população 2, a variação foi de 0,020 (MDH-1) a 0,470 (SKDH).

As frequências esperadas de heterozigotos ($\hat{H}_e$), também para cada loco na população 1, variaram de 0,127 (MDH-1) a 0,599 (SKDH), enquanto que para a população 2, a variação foi de 0,020 (MDH-1) a 0,648 (SKDH).

Como se pode observar, as maiores frequências observadas e esperadas de heterozigotos, foram para o loco SKDH e, as menores, para o MDH-1.

O índice de fixação ($\hat{I}_F$) variou na população 1 de 0,152, para o LAP-1, a 0,295, para o LAP-2, enquanto que na população 2 a variação foi de -0,008, para o MDH-1, a 0,274, para o SKDH (Tabela 14).

Na Tabela 15 são apresentados os valores do teste qui-quadrado para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os dezessete alelos nos quatro locos estudados. Para tanto, os indivíduos foram agrupados em três classes: A - nesta classe são agrupados os homozigotos para o alelo mais comum; B - reúne os heterozigotos entre alelos comum e raro; C - corresponde aos homozigotos para os alelos raros e outros heterozigotos.

Os resultados mostram significâncias ao nível de 0,01 para todos os locos, com valores do χ^2 variando de

9,7 a 38,5, com exceção do MDH-1 na população 2 que não foi significativo ($\chi^2 = 0,04$).

A análise de heterogeneidade entre o número observado (N_o) e esperado (N_e), dos dezessete alelos em ambas as populações, apresentou valores significativos para todos os locos, ao nível de 0,01 de probabilidade, com exceção do LAP-2 que apresentou valor não significativo ($\chi^2 = 7,24$). Para a média dos dezesse alelos o valor de $\chi^2 = 107,2$ foi significativo a 0,01, indicando haver heterogeneidade entre os números observados e esperados dos alelos nas populações (Tabela 16).

As estimativas do coeficiente de endogamia da população ($\hat{F}$) e da taxa de fertilização cruzada ($\hat{t}$), calculados a partir das frequências esperadas (H_e) e observadas (H_o) de heterozigotos, para os dezessete alelos em todos os locos estudados, nas duas populações são apresentadas na Tabela 17.

Os valores de $\hat{F}$ variaram de -0,0103, para o MDH-1 na população 2, a 0,2951 para o LAP-2 na população 1, indicando haver variação entre o número de homozigotos fixados nas populações. As estimativas dos desvios padrões para este parâmetro variou de 0,0257 a 0,8193.

O valor médio de $\hat{F}$ para a população 1 foi de 0,1930, enquanto que para a população 2 foi de 0,2134. O valor de $\hat{F}$ para a média das duas populações variou de 0,1644 a 0,2481, ficando a média geral para todos os locos

nas duas populações com o valor de 0,2184.

As estimativas do valor de $\hat{t}$, calculadas a partir das frequências esperadas e observadas de heterozigotos, foi bastante variável entre os locos (0,5443 a 1,0208), enquanto que a taxa média por loco, nas duas populações variou de 0,6024 a 0,7176. O erro médio variou de 0,0173 a 0,1058. A taxa média de fertilização cruzada para todos os locos, nas duas populações, foi de 0,6415 (Tabela 17).

Os valores de diversidade genética total, nas duas populações, variaram de 0,0726, para o MDH-1, a 0,6253, para o SKDH, apresentando a média dos locos com o valor 0,3356. A diversidade estimada dentro da população foi maior para o loco SKDH (0,6239) e menor para o MDH-1 (0,0712), enquanto que a média para todos os locos foi de 0,3351, indicando que a maior proporção de variabilidade genética está contida dentro da população. A diversidade genética estimada entre as populações foi muito baixa, variando de 0,0005 a 0,0014. O valor médio estimado para todos os locos nas duas populações foi de 0,0001 (Tabela 18).

4.4. Parâmetros de Diferenciação Genética entre Populações

Na Tabela 19 são apresentados os índices de

fixação ($\hat{F}_{IS}$), de acordo com WRIGHT (1978), para cada alelo por loco nas duas populações. Os valores médios por loco na população 1 variou de 0,152 (LAP-1) à 0,295 (LAP-2), enquanto que para a população 2, a variação foi de -0,008 (MDH-1) a 0,274 (SKDH).

As estimativas dos índices de fixação dentro da população ($\hat{F}_{IS}$) e para a espécie ($\hat{F}_{IT}$), e as medidas de diferenciação entre as populações ($\hat{F}_{ST}$), ainda conforme WRIGHT (1978), para cada alelo/loco são apresentadas na Tabela 20. Os valores médios do $\hat{F}_{IS}$ variaram de 0,161 para o LAP-1 a 0,246 para o SKDH.

Os valores médios de $\hat{F}_{IT}$ foram superiores para o loco SKDH e inferiores para o MDH-1, enquanto que os valores de diferenciação entre as populações ($\hat{F}_{ST}$) mantiveram-se relativamente baixos, variando de 0,002 (SKDH) a 0,018 (MDH-1), demonstrando baixa diferenciação genética entre as duas populações.

Pelo programa de computador BIOSYS-1 foram estimados, ainda, a distância e a identidade genética de NEI (1972) para as duas populações. Os valores encontrados foram de 0,997 para a distância e de 0,003 para a identidade, evidenciando a proximidade genética entre as populações.

5. DISCUSSÃO

5.1. Variabilidade Genética em Populações Naturais de Seringueira

A distribuição da variabilidade genética natural é influenciada por diversos fatores como: a) modo de reprodução; b) sistema de cruzamento; c) tamanho efetivo de população (N_e); d) distribuição geográfica; e e) fluxo gênico, expresso pela dispersão de pólen e semente (HAMRICK, 1983).

A complexidade dos ecossistemas naturais das espécies arbóreas nas florestas tropicais é indicativa de que os estudos sobre estimativas da variação genética em populações naturais devem se orientar para a quantificação desta variação, entre e dentro de populações.

Esses conhecimentos são adquiridos a partir de informações básicas sobre a biologia reprodutiva, da forma e do padrão de distribuição da espécie e das estimativas das variâncias fenotípicas e genéticas.

Os estudos fenotípicos, conforme afirmam KAGEYAMA & DIAS (1985), são efetuados em características dos indivíduos ou das populações crescendo em condições

naturais, enquanto que os estudos genotípicos se referem a indivíduos ou populações, testados sob as mesmas condições ambientais. Afirmam, ainda, que os estudos fenotípicos são mais eficientes quando se podem isolar o efeito de idade, bastante difícil em populações naturais.

A quantificação da variabilidade genética em populações naturais pode ser feita em ensaios genéticos de campo, através de métodos biométricos, ou em laboratório, utilizando o estudo das isoenzimas.

5.1.1. Sistemas Enzimáticos em Seringueira

Os trabalhos pioneiros, utilizando a técnica de eletroforese para medir a proporção de variabilidade genética existentes nas coleções de seringueira, conduziram à formulação de hipóteses sobre o controle genético dos vários sistemas enzimáticos estudados. Os sistemas leucina aminopeptidase (LAP) e shiquimato desidrogenase (SKDH) teriam a estrutura enzimática de monômeros, controlados por um loco e três alelos, enquanto que o sistema malato desidrogenase teria a estrutura de um dímero, com dois locos apresentando um e dois alelos no primeiro e no segundo loco, respectivamente (IRCA, 1986).

Na interpretação genética dos três sistemas enzimáticos analisados no presente trabalho, nas duas populações de seringueiras nativas, foram identificados um

loco com cinco alelos para o sistema shiquimado desidrogenase (SKDH); dois locos com cinco e quatro alelos, respectivamente, para o primeiro (LAP-1) e para o segundo loco (LAP-2), no sistema leucina aminopeptidase (LAP); e, analisado somente o loco mais rápido do sistema malato desidrogenase (MDH) com três alelos (Figuras 3, 4 e 5).

A estrutura monomérica das enzimas SKDH e LAP está em concordância com os resultados apresentados por IRCA (1986), CHEVALLIER et alii (1984) e CHEVALLIER (1988) e em discordância quanto ao número de alelos por loco. O número de alelos por loco, para ambos os sistemas, foi superior àqueles analisados anteriormente, apresentando, portanto, maior variabilidade genética nessas populações.

Por outro lado, os resultados de SOLEILLE (1984), analisando clones de primeira, segunda e terceira gerações de cruzamentos realizados no Oriente e na África, encontrou duas regiões de atividades enzimáticas para o LAP. A região mais rápida (A), apresentou de 2 a 4 alelos, enquanto que a região mais lenta (B) apareceu pouco difusa e com pouca atividade, não tendo por isso sido estudada.

A complexidade de interpretação do controle genético da enzima MDH normalmente tem induzido aos pesquisadores a utilizarem somente a interpretação de um, e raramente, de dois locos na análise deste sistema. A hipótese sobre o controle genético desta enzima, de apresentar estrutura dimérica, com dois locos (MDH-1 e

MDH-2), sendo 1 alelo para o MDH-1 e dois alelos para o MDH-2 (IRCA, 1986), está em desacordo com a interpretação feita neste trabalho para o loco mais rápido. O padrão de bandas apresentado neste loco permitiu identificar três alelos, com que o alelo 3, mais lento, sobrepondo-se ao alelo mais rápido de um outro possível loco.

A complexidade na interpretação desta enzima é ilustrada pelos resultados de SOLEILLE (1984), que visualizou duas zonas (A e B). Na zona B, mais lenta, identificou três bandas para os clones da coleção de Wickham. Para a zona A, mais rápida, identificou de três a oito bandas, seguidas por uma a três bandas finas, conseguindo identificar sete fenótipos diferentes nos materiais segregantes.

5.1.2. Variação Entre e Dentro de Populações de Seringueira

As estimativas de variâncias entre populações (σ_p^2), calculadas a partir das análises de variâncias das frequências dos alelos nas populações, representaram cerca de 0,25% da variação total estimada para a média de todos os alelos (Tabela 10), enquanto que a variação entre famílias, dentro de população (σ_F^2), representou 12,48% da variação total. O maior percentual de variação foi para a estimativa da variância entre genes, dentro de indivíduo,

família e população (σ_G^2), que representou 78,19% da variação total. A variação entre indivíduos dentro de famílias e populações (σ_I^2) foi de 9,18% sobre a variação total.

O valor do coeficiente de parentesco das plantas dentro de famílias (θ_1), para a média dos dezessete alelos nos quatro locos, foi de 12,7% (Tabela 11), indicando que o grau de parentesco dessas plantas é de meios irmãos.

Estes resultados fornecem indicações de que a maior parte da variabilidade genética está concentrada dentro das populações de seringueiras estudadas. Na literatura existente sobre estimativas de variabilidade genética em populações naturais da espécie, são utilizadas outras metodologias, não permitindo comparação com estes resultados.

A variabilidade genética medida pelo número médio de alelos/loco (A), nas duas populações estudadas, manteve-se relativamente alta, com 4,0 e 4,3, respectivamente, para a população 1 e 2 (Tabela 13). Isto quando comparado aos padrões apresentados em IRCA (1986), para o sistema leucina aminopeptidase (LAP) com um loco e três alelos, para o sistema malato desidrogenase (MDH-1), com um alelo e para o shiquimato desidrogenase com um loco e três alelos.

CHEVALLIER (1988) analisando material de

amostras de populações naturais de seringueiras originadas dos seringais nativos dos Estados do Acre, Rondônia e Mato Grosso, encontrou valores do número de alelos por loco polimórfico que variaram de 2,4 a 3,1.

A proporção de locos polimórficos encontrada nas duas populações estudadas também foi alta nos três sistemas estudados, utilizando-se do critério de que um loco é considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não exceder a 95%. No caso presente, verifica-se 100% para a população 1 e 75% para a população 2 (Tabela 13). A medição de locos polimórficos em plantas representativas de populações de seringueiras nativas do Estado do Acre, estimada por CHEVALLIER (1988), mostrou valores que variaram de 70% a 90%.

Os valores obtidos de heterozigidade média observada (H_o) e esperada (H_e), estimados para as duas populações ($H_o = 0,252$ e $0,229$; $H_e = 0,319$ e $0,295$, respectivamente para a população 1 e 2) foram inferiores àqueles encontrados por CHEVALLIER (1988) para 102 plantas, representando cinco municípios do Estado do Acre ($H_o = 0,324$ e $H_e = 0,299$).

HAMRICK (1989) relata que as medidas mais comumente utilizada para estimar os níveis de variação intrapopulacional, quando se trabalha com isoenzimas, são a percentagem de locos polimórficos, o número de alelos por loco e a heterozigidade média. Apresenta também valores

para 16 taxa de espécies tropicais, onde a percentagem de locos polimórficos foi de 60,9% e a heterogozidade média foi de 0,211. Portanto, a variabilidade genética encontrada nas duas populações de seringueira são superiores à média de outras espécies tropicais.

A variação genética estimada em 29 espécies de essências tropicais por HAMRICK & LOVELESS (1986), para 20 sistemas enzimáticos, demonstraram que as espécies foram polimórficas para 28% de seus locos, apresentando, em média, 1,45 alelos por loco e 2,57 alelos por loco polimórfico.

CHEVALLIER (1988) já havia destacado que o alto índice de variação da seringueira, em seu local de origem, está de acordo com o caráter perene da espécie, o presumível modo de cruzamento como forma de reprodução e a maneira de dispersão das sementes por animais ou pelo rio, como fatores que atuam para a manutenção dos altos níveis de variação na população.

Os estudos conduzidos com espécies arbóreas, para detectar os padrões de variação de características morfológicas, normalmente, são estruturados de forma que os materiais sejam reunidos por local e/ou região geográfica.

O emprego dessa metodologia requer o conhecimento da amplitude de ocorrência natural da espécie, visando a amostragem correta de representatividade da população. O número de populações a serem amostradas deve

ser em função da magnitude da área de ocorrência da espécie. Quanto ao tamanho da amostra a ser utilizada, pouco conhecimento existe na literatura, porém, presume-se que varie em função do padrão de variação de cada espécie (KAGEYAMA & DIAS, 1985).

SHIMIZU et alii (1982) consideram razoável a utilização de 25 a 50 indivíduos, para representar populações alógamas. Recomendam, também, a tomada de indivíduos a cada 100 metros, no mínimo, para evitar a inclusão de indivíduos aparentados.

Para espécies pouco estudadas, em seu local de distribuição natural, é comum o uso de observações visuais, como indicativo da forma de distribuição da variação.

Assim é que, nos seringais nativos do estado de Rondônia, GONÇALVES (1981) observou que o porte das seringueiras de terra firme (áreas não sujeitas a inundações) é bem superior ao das seringueiras situadas em área de várzeas (áreas sujeitas a inundações periódicas). Destacou também que existe grande variação nas características de circunferência do caule, período de queda de semente, características da casca, tamanho de semente, formato da copa e densidade de árvores por hectare.

Por outro lado, PAIVA (1981), observando os seringais nativos do estado de Mato Grosso, destacou a

existência de menor variabilidade entre plantas nos seringais de terra firme, em comparação com seringais de várzeas, para as características de forma, tamanho e coloração de sementes. Levantou também a hipótese de que os seringais em áreas de várzeas devem apresentar maior variabilidade genética, devido ao mecanismo de dispersão de sementes que é feito pelo rio. Este mecanismo favorece uma dispersão (fluxo gênico) mais ampla e maior concentração de tipos diferentes por área ocupada.

Existem poucos estudos que quantificam a variabilidade genética em populações de seringueiras nativas. Assim, PAIVA (1980), utilizando de métodos biométricos em famílias de meios irmãos de plantas nativas, concluiu que, resguardados os problemas relativos à amostragem da população e do erro das estimativas, os seringais nativos compreendidos pela região do município de Manicoré, no estado do Amazonas, possuem pouca variabilidade genética aproveitável para o melhoramento da seringueira.

Os resultados obtidos de diversidade genética na população, medida pelo índice de NEI (1973), através da partição da diversidade genética total (H_T) nos componentes de diversidade dentro de populações (H_S) e entre populações (D_{ST}), apresentou valor relativamente elevado para a diversidade total. O valor de $H_T = 0,3356$ (Tabela 18), é superior aos padrões apresentados por HAMRICK (1983) em 122

estudos, envolvendo 91 espécies de plantas, 47 gêneros e 19 famílias, que variaram de 0,172 a 0,712, para 20 tipos de populações naturais, com $\bar{H}_T = 0,3039$.

A maior proporção da variabilidade genética detectada na seringueira está contida dentro da população, que apresentou valor de $H_S = 0,3351$ (Tabela 18), correspondendo a 99,85% da variação total, enquanto que a variação entre populações correspondeu a somente 0,03% da variação total ($G_{ST} = 0,0003$). Estes resultados demonstram que houve um fluxo gênico entre os dois grupos de plantas, uma vez que, apesar da aparente descontinuidade entre os dois grupos, o processo de diferenciação mostra-se ainda incipiente.

A idéia sobre o tamanho de população, reinante entre os melhoristas de seringueira, é aquela que envolve a própria estrutura dos seringais nativos, que consideram uma população como sendo formada por um ou poucos seringais.

Na estrutura do seringal nativo tem-se a "colocação", que geralmente é formada por uma a três "estradas-de-corte", sendo cada estrada constituída por um número variável de plantas (120-300), correspondendo à tarefa de um dia de trabalho (extração de látex das plantas) do seringueiro. Na maioria das vezes um seringal nativo é formado por várias colocações, porém bastante distanciadas entre si. Normalmente o seringueiro gasta de 3

a 6 horas para a extração do látex das seringueiras, variando em função do número de plantas existentes na estrada.

Se os resultados apresentados neste trabalho, sobre a grande quantidade de variabilidade contida dentro da população, apesar do reduzido número de sistemas enzimáticos estudados, e a pouca diferenciação entre as populações, forem confirmadas em trabalhos adicionais futuros, isto, além das implicações que causariam para a coleta e conservação dos recursos genéticos, confirmaria o extensivo fluxo gênico entre as populações.

O movimento de genes entre populações ou subdivisões da população apresentam dois efeitos distintos, porém interrelacionados, sobre a estrutura genética das populações. Altas taxas de fluxo gênico aumentam o tamanho efetivo da população (N_e) e reduzem a diferenciação genética por deriva ou seleção natural (JAIN & BRADSHAW, 1966). Por outro lado, baixos níveis de fluxo gênico afetam diretamente a variação, dentro de populações, pela introdução de novos alelos e genótipos, porém podem apresentar relativamente pouco efeito sobre as frequências dos alelos comuns (ANTONOVICS, 1968).

O fluxo gênico, medido pelo fluxo de alelos neutros entre populações, pode ser quantificado pela estimativa do valor de " Nm ", onde N - o tamanho efetivo da população e m - a taxa média da migração de genes via pólen

e sementes (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1991). Se o valor de N_m é menor do que 1, podem ocorrer mudanças nas frequências dos alelos devido à deriva genética dos alelos neutros.

Para alelos identificados por eletroforese, os quais são frequentemente considerados como variações neutras, os valores de N_m para 40 espécies arbóreas indicaram altos níveis de fluxo gênico ($N_m > 1,0$). Isto pode ser explicado, devido muitas espécies apresentarem altos níveis na taxa de cruzamento e existir uma associação positiva entre taxa de cruzamento e o fluxo gênico (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1991).

A proporção de diversidade genética entre populações em relação a diversidade genética total (D_{ST} / H_T), definida como G_{ST} , foi mostrado por NEI (1977) como um parâmetro equivalente ao F_{ST} de WRIGHT (1965). Os valores médios do F_{ST} por loco encontrados no presente trabalho variaram de 0,002 a 0,018 (Tabela 20), evidenciando, novamente, pequena diversidade genética entre as populações.

5.1.3. Frequência Alélica em Seringueira

A frequência dos alelos por loco, nas duas populações estudadas de seringueira apresentou valores semelhantes, com exceção para o alelo 2 do LAP-2 que não foi detectado na população 1 e apresentou uma frequência de

0,02% na população 2 e para os alelos 2 e 3 da MDH-1 que ocorreram nas frequências de 1,92% e 4,80%, respectivamente, na população 1, e não estavam presentes na população 2 (Tabela 12). O percentual de frequência de alelos raros é variável conforme a origem das populações; de acordo com CHEVALLIER (1988), foram encontrados percentuais de 23%, 41% e 34% para alelos nas populações do Mato Grosso, Acre e Rondônia, respectivamente. Todavia, não foi identificado nenhum alelo específico de qualquer população, mas somente variação em suas frequências.

METTLER & GREGG (1973) discorrendo sobre o tamanho da população destacaram que, entre os fatores que determinam a composição genética da amostra de gametas formadora da geração filial, é preciso incluir as variações de acaso, devidas à amostragem. Estas podem ter uma importância considerável, pois todas as populações são finitas. Assim, quanto menor o tamanho da população, maior a possibilidade de haver diferenças entre as frequências dos genes contidos nos gametas e as frequências gênicas da população parental. Tais diferenças são provocadas por erros de amostragem. Nas populações grandes as flutuações aleatórias das frequências gênicas são insignificantes e podem ser desprezadas.

Por outro lado, desconsiderando eventuais erros de amostragem nas duas populações de seringueiras estudadas, a frequência de alelos raros poderia aumentar em

função do aumento da distância física entre elas. Neste caso, por exemplo, outras populações distanciadas cerca de 5 ou 10 vezes mais que as anteriores, ou seja, 40km ou 80km, já poderiam apresentar variações genéticas mais evidentes, por conta do aumento da frequência e/ou do número de alelos raros.

Os valores do qui-quadrado para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco foram obtidos, considerando-se três classes do número de homozigotos e heterozigotos observados e esperados, com a classe A reunindo todos os homozigotos para o alelo mais comum, a classe B os heterozigotos entre os alelos comuns/raros e, na classe C os homozigotos raros e os outros heterozigotos. Estes foram todos significativos, com exceção do loco MDH-1 na população 2, que apresentou valor não significativo (Tabela 15). Isso demonstra que as duas populações não estão em equilíbrio para a maioria dos locos estudados.

A falta de equilíbrio nas populações pode não refletir o que ocorre com as populações na fase adulta, tendo em vista que a seringueira nativa anualmente produz muitas sementes, no período que vai de janeiro a março. As sementes que conseguem escapar da predação por animais germinam normalmente, formando verdadeiro tapete de mudas ao redor da planta matriz. No entanto, poucas são as mudas que conseguem atingir o estágio adulto de planta, devido a seringueira ser uma espécie heliófita, que necessita da

abertura de uma clareira na floresta para atender as necessidades de luminosidade.

Como pode ser deduzido, o material para análise foi constituído de sementes que, em condições naturais, vão formar mudas, das quais, eventualmente, poucas chegam a fase de planta adulta. Portanto, o desequilíbrio manifestado nesta fase estudada pode não refletir aquele existente nas plantas adultas, bem como todas as estimativas dos demais parâmetros populacionais podem estar sub e/ou super estimados.

Por outro lado, a heterogeneidade entre os números observados e esperados dos dezessete alelos nas duas populações, manifestado pela significância dos qui-quadrados em todos os locos, com exceção do LAP-2 (Tabela 16), pode ser explicada pelo elevado número de plantas analisadas, que permitiram a detecção de pequenas diferenças entre os números observados e esperados de alelos em cada população. Isto pode ser devido também a alta sensibilidade do teste em detectar pequenas diferenças, porém essas diferenças não foram suficientes para apresentar divergência genética entre as populações.

5.2. Divergência Genética entre as Populações Naturais de Seringueira

A diferenciação de populações, ao nível de

uma escala microgeográfica, é um fenômeno reconhecido e, de certo modo, bem entendido para algumas espécies. Populações adjacentes que diferem em suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas são resultantes da atividade do homem ou de fenômenos da natureza. LIU & GODT (1983) relacionam uma série de espécies que apresentam diferenciações entre populações a pequenas distâncias, tendo como principais causas o estresse hídrico, salinidade, acidez e toxidez do solo.

A divisão de uma população em unidades menores e semi isoladas pode ser o resultado direto da ação do homem, através da construção de estradas, barragens, desmatamentos e outras que podem restringir e, em alguns casos, eliminar o fluxo gênico entre populações adjacentes. As espécies com ampla distribuição geográfica frequentemente desenvolvem populações adaptadas localmente que, na maioria das vezes, são geneticamente distintas.

Na última década, um volume considerável de informações foi acumulado sobre a divergência genética entre populações ao nível bioquímico, obtida pela determinação da divergência nas frequências gênicas, usando-se dados de aloenzimas.

Nas estimativas dessas diferenciações, normalmente utilizam-se a metodologia de NEI (1972), que estima a distância genética entre populações, através do número de substituições gênicas acumuladas, por loco, entre

populações. Estas substituições gênicas são atribuídas à ação da seleção natural, da mutação e/ou da deriva genética.

As estimativas do índice de identidade gênica normalizado de NEI (1972), para as duas populações estudadas de seringueira, apresentou o valor de 0,997 e para a distância genética o valor de 0,003, indicando que as duas populações estão geneticamente muito próximas.

A diversidade genética entre as duas populações, estimada pelo índice D_{st} (NEI, 1973), para a média dos quatro locos nas duas populações, foi também muito baixa, apresentando o valor de 0,0001 (Tabela 18), que corresponde a 0,03% da diversidade genética total.

Outro parâmetro que avalia a diversidade genética entre populações é o coeficiente de distância genética de Cockerham (θ_2), estimado a partir da análise de variância das frequências dos alelos na população. O valor de θ_2 estimado para cada alelo, foi variável, porém relativamente baixo para todos os alelos, inclusive alguns coeficientes apresentaram valores negativos, provavelmente indicando que o valor real seja zero. O coeficiente médio para os dezessete alelos foi de 0,0025 (Tabela 11).

Como se pode observar, as três estimativas que avaliam as diferenças genéticas entre populações, utilizando metodologias diferentes, apresentaram valores baixos e similares, levando à conclusão de que as duas

populações estudadas de seringueiras nativas são geneticamente semelhantes. Isto, de certo modo, já era esperado, considerando a distância entre os dois seringais e por situarem-se em área de terra-firme que, comparado aos seringais de várzeas, fenotipicamente são mais semelhantes.

A localização dos seringais nativos, onde foram coletados os materiais para análises, distam cerca de 8 Km entre si e situam-se à margem direita da rodovia BR 364, que liga a cidade de Rio Branco (AC) a Porto Velho (RO). A vegetação existente entre um seringal e outro ao longo da rodovia já não é a original, devido à ação do homem na implementação de atividades agropecuárias. É possível que esta descontinuidade na vegetação original tenha interrompido o fluxo gênico entre as plantas dos dois seringais, iniciando um processo de diferenciação entre os dois grupos de plantas, que poderá culminar na formação de duas populações geneticamente diferentes.

A propósito do baixo valor do índice de diversidade genética entre populações, BUCKLEY et alii (1988), utilizando a técnica de eletroforese, analisaram plantas de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) amostradas em duas populações naturais, localizadas uma no Estado do Acre e a outra no Amazonas. O baixo nível de diferenciação genética encontrado entre as populações, cerca de 3,75% em relação a diversidade total, causou surpresa, tendo em vista a distância geográfica entre as

populações, o tipo de distribuição das plantas na população e a dispersão das sementes. Para explicar estes resultados, esses autores levantam a hipótese de que as duas populações tenham sido originadas de uma população ancestral comum, ou mesmo a ação antrópica.

HAMRICK (1983) demonstra que o sistema de cruzamento e o mecanismo de dispersão de sementes das espécies afetam diretamente a distribuição da variação genética, tanto dentro como entre populações. As espécies com maior potencial de movimentação de genes, as polinizadas pelo vento e aquelas que tenham mecanismo de dispersão das sementes pelo vento mostraram, relativamente, pouca diferenciação genética entre suas populações.

As espécies tipicamente tropicais ocorrem em baixa densidade (O'MALLEY & BAWA, 1987). ASHTON (1984) relata que muitas espécies das florestas, no sudeste asiático, têm somente 1 a 2 indivíduos reprodutivos por hectare. Esta baixa densidade tem motivado várias especulações, sobre os sistemas de reprodução dessas plantas, pois variam de um alto grau de endogamia, devido à autofecundação (FEDOROV, 1966) até um amplo cruzamento (ASHTON, 1969). KAGEYAMA et alii (1992) referem-se a riqueza do ecossistema tropical como sendo devido a frequência de espécies raras, que ocorrem em baixa densidade, com menos de um indivíduo por hectare. Levantam ainda as hipóteses de que este grupo de plantas tem um

polinizador específico, sofre uma seleção dependente da frequência e tem um sistema de reprodução alternativo.

Os estudos sobre a distribuição da seringueira, em seu ambiente natural, são bastante empíricos e se baseiam, principalmente, em observações de pesquisadores que se dedicaram a coleta de recursos genéticos e/ou a estudos botânicos. Com base nessas observações, a densidade da seringueira é considerada como sendo de 4 a 6 plantas por hectare. O tipo de distribuição da seringueira nas populações naturais é agrupada, considerando que a "estrada-de-corte" representa o mapeamento de todas as plantas adultas naquela unidade de área, interligadas por uma "picada" que dá acesso a cada planta.

5.3. Taxas de Cruzamento e Coeficientes de Endogamia em Seringueira

5.3.1. Taxas de Cruzamento em Seringueira

Os métodos tradicionais de avaliação do sistema de reprodução de uma espécie baseiam-se na observação de cruzamentos, no comportamento dos agentes polinizadores, no exame da morfologia floral das plantas, ou nos resultados de experimentos com polinizações controladas. Estes métodos, apesar de fornecerem indicações

sobre o sistema de reprodução da espécie, não possibilitam uma medida direta do sucesso reprodutivo nas populações e se tornam inadequados para a análise a nível populacional.

A determinação da taxa de cruzamento em populações naturais sempre teve limitações, tais como: a distância irregular entre as plantas, principalmente em espécies arbóreas, as barreiras naturais entre as plantas, a identificação de um bom marcador genético, e a expressão de dominância exibida, na maioria das vezes, por esses marcadores. RITLAND & JAIN (1981) destacam a força e a versatilidade dos processos de estimação, quando são utilizados dados de eletroforese, considerando que muitos locos segregantes com alelos co-dominantes podem, frequentemente, ser encontrados nas populações.

As estimativas obtidas para as taxas de fertilização cruzada em seringueira, calculadas a partir da análise de variância das frequências dos alelos nas populações, demonstram ser as mesmas bastante variáveis, quando estimadas para cada alelo; estas apresentam menor variação para a média entre os locos. A taxa média para os dezessete alelos estudados, nos quatro locos, apresentou uma taxa de 64,46% de cruzamento para a espécie (Tabela 11). A estimativa de $\hat{t}$, para a média de cada loco, variou de 60,08% (SKDH) a 71,47% (LAP-1).

Da mesma forma, a estimativa obtida para a taxa de fertilização cruzada, calculada a partir da

frequência observada e esperada de heterozigotos conforme LI (1955), apresentou o valor de 64,15% para a média dos dezessete alelos nas duas populações (Tabela 17). A variação de $\hat{t}$ para a população 1 foi de 54,43% a 75,44%, com média de 67,64%, enquanto que para a população 2 a variação foi de 56,96% a 100,2%, com média de 64,83%. Os desvios padrões mantiveram-se em níveis relativamente baixos, com exceção para o loco MDH-1 da população 2 que foi alto (1,6729), e que também apresentou valor de $\hat{t}$ superior a 100%.

Para os melhoristas de seringueira, a taxa de cruzamento natural da espécie sempre foi uma incógnita, apesar da sua grande importância na definição de estratégias de melhoramento e no entendimento da estrutura genética das populações.

As pesquisas com seringueira no Brasil sempre foram impulsionadas pela necessidade premente de aumentar a produção nacional de borracha, ou seja, as prioridades de pesquisas consideravam, como mais importantes, a geração de tecnologias que causassem impacto imediato sobre a produtividade dos clones no plantio comercial. O predomínio desse racíonio imediatista, não resta dúvida, causou sérios danos à pesquisa científica, principalmente devido ao fato de a seringueira ser uma espécie perene. Os estudos básicos na espécie, envolvendo questões importantes para o melhoramento da cultura, tais como: identificação do agente

polinizador, estrutura genética das populações naturais, taxa de fertilização cruzada, taxa de autofecundação natural, endogamia, entre outros, sempre foram relegadas a um plano secundário.

Desta forma, os estudos sobre a polinização natural da seringueira, além de insipientes, datam da década de 50 que, não resta dúvida, tiveram seus méritos na época.

Assim, WARMKE (1951 e 1952), estudando o processo de polinização da seringueira em Porto Rico e no Brasil, ressalta que, apesar dos estudos anteriores, o processo de polinização da seringueira continua sendo um quebra-cabeça. O autor destaca o fato da seringueira ser monóica, com anteras e estigmas inseridos na mesma inflorescência, porém em flores separadas, tornando-se necessária a transferência do pólen. Destaca, ainda, que em clones autoincompatíveis essa transferência torna-se obrigatória entre plantas. Segundo ainda o mesmo autor, os agentes polinizadores da seringueira em Porto Rico são pequenos dípteros (família *Heleidae*) e trips, enquanto que no Brasil foram identificados três gêneros diferentes para ambos os tipos de insetos.

As observações visuais do autor do presente trabalho, quando da coleta em seringais nativos na região Amazônica, no período de florescimento natural, encontrou muitas abelhas pequenas, de coloração amarela, em

quantidades bastante elevadas, visitando as seringueiras, causando não só perturbação ao coletor da seringueira, que se encontrava no alto da árvore, como aos membros da missão que se encontravam embaixo das plantas.

Os grãos de pólen da seringueira são pegajosos e perdem sua viabilidade em pouco tempo, em temperatura normal do ambiente, sendo uma das razões pelas quais a polinização controlada é efetuada no período da manhã. HARIHAR & YEANG (1984), estudando o motivo da baixa frutificação após a polinização controlada em seringueira, concluíram que a causa determinante do baixo rendimento na frutificação é o baixo número de grãos de pólen que são depositados no estigma da flor feminina, durante o processo de polinização controlada.

FERWERDA & WIT (1969) relatam que a seringueira não tem mostrado preferência pela polinização cruzada sobre a autopolinização, embora a percentagem de frutificação, obtida em polinizações controladas, tenda a ser ligeiramente menor após a autopolinização, do que após a polinização cruzada. Por outro lado, BOUHARMONT (1962) encontrou apreciáveis diferenças no processo de desenvolvimento após a fertilização e na percentagem definitiva de frutificação, em ambas as formas de polinização. Destaca também que a maioria das sementes de uma determinada árvore seria derivada da autofertilização, porque a transferência de pólen, intraplanta, ocorreria

mais prontamente do que a transferência interplanta.

5.3.2. Coeficientes de Endogamia em Seringueira

As estimativas obtidas para os coeficientes de endogamia dentro da população ($\hat{f}$), ao nível de populações de seringueira, e do coeficiente médio das plantas nas populações ($\hat{F}$), ao nível da espécie, calculados a partir da análise de variância das frequências dos alelos nas duas populações, apresentaram valores similares para a média dos dezessete alelos analisados (21,61% e 21,81%, respectivamente) (Tabela 11).

Similarmente, os valores estimados de $\hat{F}$ pela metodologia de LI (1955) foram de 19,30%, 21,34% e 21,84% para as populações 1 e 2 e para a média delas, respectivamente (Tabela 17).

As estimativas dos índices de fixação dentro de população ($\hat{F}_{IS}$), ou F-estatístico de WRIGHT (1965), para a média de cada loco, nas duas populações, variaram de 16,10% a 24,60% (Tabela 20).

Como se pode constatar, a taxa média de endogamia para a seringueira, em populações naturais, esteve sempre acima de 20% o que, sem discutir o mérito das metodologias utilizadas, destaca o fato de todas as estimativas apresentarem resultados altos e coerentes entre si. Com estes resultados não se pode afirmar que a

endogamia tenha sido originada de autofecundação das plantas. Ou seja, como a taxa de fertilização cruzada é cerca de 64%, a taxa de autofecundação seria de 36%, tendo em vista que a endogamia pode também ser originada do cruzamento entre plantas aparentadas.

SIMMONDS (1989) relata que os estudos sobre polinização cruzada, em plantios de seringueira, aparentemente não têm sido muito bem entendidos, pelo fato de a ocorrência de plantas anãs, causada, possivelmente, pela autofecundação de plantas em jardins de sementes de boa procedência. Este autor também destaca que a taxa de autofecundação varia em torno de 16%-28%. Relata, ainda, que a taxa de autofecundação estimada para o clone PB 5/51, no Prang Besar (empresa privada de plantio de seringueira na Malásia), foi de 22%.

O nível de conhecimento dos ecossistemas tropicais tem aumentado nas últimas décadas, o que tem esclarecido muitas dúvidas e, em alguns casos, mudanças de conceitos existente anteriormente. CORNER (1954) sugeriu a autogamia como sistema de reprodução predominante na floresta tropical, devido à assincronia na abertura das flores e a mobilidade limitada dos polinizadores. Posteriormente, BAKER (1959) propôs que a estrutura complexa da floresta impede o movimento de polinizadores entre as árvores e, como consequência, a maioria das árvores seria autopolinizada. Nesta mesma linha, FEDOROV

(1966) também defendia a autogamia e a existência de endogamia nas plantas tropicais, baseado no fato da assincronia do florescimento, isolamento espacial entre indivíduos de uma mesma espécie e a baixa densidade populacional.

Por outro lado, ASHTON (1969) relatou que as árvores tropicais poderiam ser predominantemente de cruzamento. Por sua vez, JANZEN (1971) demonstrou que certos polinizadores podiam forragear a longas distâncias, com possibilidade de trazer pólen de longas distâncias. Finalmente, BAWA (1974) com base em estudo mais profundo, demonstrou que a alogamia predominava nas espécies tropicais da floresta tropical semidecídua da Costa Rica. Relatou, também, que a floresta tropical apresentava 68% de espécies hermafroditas, 10% de monóicas e 22% de espécies dióicas, o que diferia drasticamente das florestas de clima temperado.

Vários autores têm procurado obter mais evidências que assegurem a generalidade da predominância da alogamia para as espécies arbóreas. Os dados de Tomlinson (1974), citado por BAWA (1976), sobre morfologia floral de um grande número de espécies arbóreas do sul da Flórida, indicam também a predominância de fertilização cruzada.

BULLOCK (1985), estudando o sistema reprodutivo de 33 espécies arbóreas e arbustivas do México, concluiu que 76% das espécies se apresentavam

autoincompatíveis.

As árvores da floresta tropical são de vida longa e alógamas e, conforme BAWA & KRUGMAN (1986), apresentam características demográficas próprias e diversificados modos de reprodução. Ocorrem em baixa densidade e são polinizadas desde por pequenas vespas até grandes morcegos, além de terem suas sementes dispersadas por uma ampla diversidade de animais (BAWA et alii, 1985).

O'MALLEY et alii (1988), utilizando a metodologia de multilocos, estimaram uma taxa de cruzamento de $\hat{t} = 0,85 \pm 0,03$ para a castanha-do-Brasil, destacando que a alogamia é predominante nesta espécie, porém não descartou a possibilidade de ocorrer baixos níveis de endogamia.

Os ecossistemas tropicais, sem dúvida, apresentam maior diversidade de espécies e maior complexidade nas interrelações entre organismos. A diversidade é resultante da somatória de vários fatores interagindo no ecossistema. Como consequência, os indivíduos de uma espécie, de certa forma, ficam isolados entre outros indivíduos de outras espécies. Isso tem implicações na dinâmica da floresta, em termos de interação planta x animal, os quais são interdependentes e bem coadaptados, dando uma integração e estabilidade ao ecossistema (PIANKA, 1983).

Baseado nesses argumentos, pode-se inferir

que cada espécie da floresta tropical desenvolveu estratégias próprias de adaptação, objetivando conviver harmonicamente e em equilíbrio dinâmico com a heterogeneidade do ecossistema. O que se pode inferir, ainda, é que as estratégias utilizadas por uma espécie podem não servir de referência para outras espécies.

Desse modo, é aceitável admitir que a taxa de cruzamento natural, estimada para a seringueira, apesar de baixa para os padrões de uma espécie tida como alógama, assim como o grau de endogamia da espécie, sejam estratégias biológicas desenvolvida pela espécie, para poder manter o equilíbrio no ecossistema tropical. É sabido que a seringueira cultivada em ambiente tropical, é dizimada pelo patógeno (*Microcyclus ulei*) e, no entanto, convive com esse fungo harmonicamente em equilíbrio, nas populações naturais, o que reforça a tese levantada.

Outra hipótese que pode explicar essa baixa taxa de fertilização cruzada é uma eventual endogamia já existente na população, considerando que, pelas metodologias utilizadas, a taxa de cruzamento é estimada em função do coeficiente de endogamia da população. Desta forma, é possível que o coeficiente de endogamia estimado nesta geração filial esteja aumentado, em função do cruzamento entre plantas parcialmente aparentadas. Neste caso, a taxa de fertilização cruzada estaria subestimada.

5.4. Estratégias de Melhoramento Genético para a seringueira

5.4.1. Estratégia Atual do Melhoramento Genético

As diferenças ecológicas peculiares a cada região onde são desenvolvidas as pesquisas com melhoramento da seringueira, associadas ao nível de tecnologia utilizado no plantio comercial, são fatores que determinam uma abordagem diferencial dos problemas de pesquisa da espécie.

Face às limitações da baixa produção de borracha dos clones e à pressão de patógenos existentes, principalmente na região Amazônica e no sul da Bahia, o objetivo maior dos programas de melhoramento desenvolvidos em Manaus (AM), Belém (PA) e Bahia ainda consiste em associar em um clone essas duas características. A estratégia utilizada consiste, basicamente, no cruzamento entre clones que possuam as características favoráveis de produção de borracha e de resistência à doença, seguida da avaliação das progênies e clonagem das plantas superiores.

A perspectiva de progresso na seleção de clones produtivos é maior, quando a incidência de doenças é baixa. Assim é que a região do planalto paulista oferece condições para o desenvolvimento de um programa de melhoramento, tendo como objetivo principal o aumento da produção de borracha. À semelhança dos programas

desenvolvidos no sudeste asiático, nessa região existem perspectivas de obtenção de progressos genéticos, tão grande quanto aos obtidos na Malásia.

A propagação vegetativa da seringueira, normalmente conduz a uniformidade genética dos plantios, ao contrário do que ocorre nas populações naturais, onde o nível de variabilidade genética, contida dentro das populações, tem um significado biológico importante para o equilíbrio do ecossistema.

ALLARD (1971) destaca que, segundo Vavilov, o centro de origem de uma espécie coincide com as áreas onde existe maior quantidade de variabilidade. Esses centros reúnem também grande diversidade de insetos e microorganismos, que fazem parte do ecossistema. Assim, pode-se explicar a presença de grande variabilidade genética nas populações naturais.

5.4.2. Proposição de Estratégias de Melhoramento Genético

A grande quantidade de variabilidade genética encontrada dentro das populações de seringueiras, associada à forma de distribuição dos indivíduos nas populações naturais, é um forte indicativo de que, no cultivo racional da seringueira nas regiões-problema, deve ser evitada a uniformidade genética do material de plantio, haja vista

que a experiência atual dos plantios nessas regiões tem conduzido, com raras exceções, ao insucesso do cultivo.

Essa mudança no enfoque do melhoramento genético implicaria em profundas modificações nos atuais métodos de melhoramento, utilizados nas instituições de pesquisa, em ambientes favoráveis à incidência de doenças. Neste caso, a população base para o melhorista passaria de um conjunto reduzido de clones para um amplo conjunto de plantas, contendo uma porção bem maior de variabilidade genética. Isto possibilitaria, também, a maior exploração da variabilidade genética natural existente.

Dentro dessa linha de raciocínio, o melhoramento genético deixaria de explorar só o vigor de híbrido dos cruzamentos. Ou seja, o mais importante não seria a obtenção de clones produtivos e resistentes, mas sim os descendentes das plantas superiores, nas regiões-problema, passando-se a explorar o melhoramento de populações. Esta estratégia de melhoramento, a médio e longo prazo, teria como objetivo o de obter sementes melhoradas de seringueira, visando o pequeno produtor, em detrimento de uma maior produtividade de borracha, mas com a garantia de produção e sem a necessidade de controle fitossanitário.

Outra forma de representar o nível de variabilidade genética, contida dentro das populações naturais, é incrementar as pesquisas com policultivos. A

mistura de culturas perenes de expressão econômica, tende a se tornar uma realidade nas regiões tropicais, como forma de representar a diversidade das florestas tropicais. Neste caso, o plantio de clones elites de seringueira em associação com outras culturas, pode também se constituir em uma alternativa agrícola viável para essas regiões, desde que sejam respeitadas as características básicas das populações naturais.

A descoberta de alternativas agrícolas economicamente viáveis para a região Amazônica, principalmente com culturas perenes, imbuí-se de um cunho social bastante elevado, se o modelo for adequado às características do homem regional. A alternativa deve atender às necessidades básicas do amazônide, além de representar uma solução para a ocupação do relativo vazio demográfico.

Outro aspecto a ser discutido, como estratégias de melhoramento da seringueira, refere-se ao elevado grau de endogamia encontrado nas populações naturais.

O fenômeno da depressão endogâmica em seringueira já foi observado há bastante tempo (SHARP, 1940 e 1951; ROSS & BROOKSON, 1960). TAN & SUBRAMANIAN (1976) mostraram que progênies autofecundadas são inferiores às progênies exocruzadas, em relação ao vigor e à produção de borracha. Presume-se que o efeito da endogamia é muito

comum em seringueira, porém segundo BOUYCHOU (1969) a sua intensidade é variável nos diferentes clones. HO (1979), analisando os programas de melhoramento genético da seringueira do RRIM (Rubber Research Institute of Malaysia) e do Prang Besar, relata que a endogamia tem resultados adversos na produção e vigor das plantas, além de reduzir o sucesso da polinização e aumentar a proporção de plantas raquílicas.

POLHAMUS (1962) refere-se a hipótese de Bouychou (1956) sobre a produção de linhagens endógamas em seringueira; isto baseado nos estudos conduzidos nos materiais originados das sementes de Wickham (primeiras sementes de seringueira introduzidas no oriente), que o surpreenderam com o desempenho do vigor na primeira geração de plantas produzidas. Contudo, POLHAMUS (1962) levanta a idéia de ser difícil de aceitar esta hipótese devido às evidências experimentais demonstrarem o contrário. Porém, destaca que os outros caminhos já foram seguidos e a endogamia foi o único deixado de lado, devendo ser considerada no melhoramento futuro.

Por outro lado, PAIVA & GONÇALVES (1989), analisando o desempenho do programa de melhoramento desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa da Seringueira e Dendê (CNPSP), em Manaus (AM), destacam que, a propósito do maior vigor das progênies oriundas de cruzamentos de clones primários de *H. brasiliensis*, este deve ser um

caminho a ser explorado mais intensamente. Os clones nacionais e estrangeiros que foram destaque, inclusive alguns ainda continuam sendo, em relação aos clones de gerações mais avançadas, foram originados de cruzamento entre clones primários, como o RRIM 600, 527, e 623, IAN 717, 710, 713, e 873, Fx 25, 985, 2261, 4098 e 3864, PB 5/51, PR 251, 255 e 261.

É possível que os clones primários orientais, provenientes de árvores matrizes selecionadas após várias gerações de intercruzamentos das plantas originadas das sementes de Wickham (população original de 22 sementes, conforme HO (1979), conservem um certo grau de endogamia, devido ao cruzamento entre plantas aparentadas. Assim, o cruzamento entre clones geneticamente divergentes possibilitaria a manifestação do vigor heterótico nos descendentes.

O isolamento dos indivíduos de seringueira nas condições nativas, associado à grande produção de sementes, e considerando que a probabilidade de os agentes polinizadores (insetos) visitarem uma flor de outra planta é muito menor do que o inseto visitar outra flor na mesma planta, devido a pequena distância de voo do inseto (WARMKE, 1951 e 1952), segundo BOUYCHOU (1956), aceita-se a idéia de que parte da produção de sementes nativas seria originada de autofecundação. O cruzamento entre plantas matrizes, onde exista a estruturação de indivíduos

aparentados, poderia também provocar a endogamia.

De fato, o sistema reprodutivo pode ser adaptativo em maximizar a fertilização em situações de escassez dos principais polinizadores da espécie (CROME & IRVINE, 1986), em razão de a seleção poder modificar o sistema de cruzamento em plantas, levando diferentes populações da mesma espécie a, frequentemente, praticarem diferentes níveis de endogamia (ALLARD, 1975).

A autofecundação parece promover o desenvolvimento e a manutenção da adaptação dentro de populações e, ao mesmo tempo, facilitar o desenvolvimento da diferenciação espacial, por impedimento do fluxo gênico entre populações (ALLARD, 1988).

O grau de endogamia estimado para a seringueira nas populações naturais, seja devido à autofecundação ou ao cruzamento entre plantas aparentadas, deve apresentar uma vantagem adaptativa. Uma possibilidade seria a de provocar a homozigose dos genes deletérios e devido à seleção natural eliminar as plantas não adaptadas ao ambiente natural. Portanto, o cruzamento entre clones primários de origens diferentes, que são plantas que passaram pelo crivo da seleção natural e artificial, antes da clonagem, podem expressar diferentes graus de vigor heterótico. A confirmação desta hipótese abriria um outro campo para ser explorado pelo melhoramento genético, desde que fossem provocados cruzamentos entre clones aparentados,

seguidos de seleção e cruzamentos entre plantas geneticamente distintas.

METTLER & GREGG (1973) relatam que a autofecundação é a forma mais intensa de endogamia. Contudo a endogamia também ocorre em espécies bissexuadas, quando os indivíduos que se acasalam têm uma relação de parentesco entre si. Neste caso, há também uma redução de heterozigotos, porém menos intensa do que a autofecundação. O coeficiente de endogamia não expressa apenas a endogamia média de todos os membros de uma população, numa dada geração, mas expressa também a probabilidade de um indivíduo ter alelos idênticos por descendência num dado loco.

5.5. Estratégias de Coleta de Recursos Genéticos de Seringueira

A grande variabilidade genética da seringueira é uma das principais riquezas de que dispõem os melhoristas, para ampliar a potencialidade de cultivo dessa espécie vegetal. Entretanto, na Amazônia brasileira, centro de diversidade do gênero *Hevea*, extensas áreas estão sendo desmatadas e alagadas, em consequência da expansão da agricultura e da construção de hidrelétricas, respectivamente, fazendo com que haja desaparecimento de inúmeras populações locais de seringueiras, de riqueza

genética de valor imensurável.

As atividades de coleta de germoplasma distinguem-se em dois objetivos básicos, quanto ao tipo de material coletado. Quando o material coletado é composto de hastes (vergõntea) das plantas, ela objetiva a clonagem e o teste imediato dos novos clones, com recomendações para plantio comercial em tempo relativamente curto, que pode levar cerca de onze anos. Neste caso, todo o material coletado é preservado. Quando o material coletado é a semente, é necessário fazer uma seleção branda, para depois conservar em coleções vivas. No melhoramento desse material são necessários, pelos menos, quinze anos para se fazerem as primeiras recomendações para o plantio comercial, ao nível de pequena escala (GONÇALVES et alii, 1983).

PAIVA et alii (1986) resumem o aproveitamento dos recursos genético da seringueira, desde da primeira coleta realizada em 1945 até 1984, destacando que a preservação da variabilidade genética, através da coleta de sementes, tem recebido pouco destaque, em função do custo de manutenção das coleções vivas. É conveniente ressaltar, ainda, que os critérios utilizados nas coletas têm se baseado em informações locais, sobre a produtividade dos seringais e das plantas, afora a experiência dos melhoristas responsáveis pelas coletas, todavia sem nenhuma base científica.

A maior proporção observada para a

variabilidade contida dentro das populações de seringueira (Tabela 16), demonstrada pelos parâmetros de NEI (1973), aliada à indefinição do tamanho da população, é indicativo que a coleta de seringueira para a conservação de recursos genéticos pode ser direcionada para uma ou poucas populações, em uma determinada região de coleta, e um maior número de indivíduos por população. Com este procedimento, coleta-se maior representatividade genética da espécie a um custo menor.

Sem dúvida, a concentração de esforços na conservação genética de espécies arbóreas deve ser determinada pela magnitude relativa da variação genética entre e dentro de populações, de modo a preservar o máximo de variabilidade das populações naturais.

No caso do presente trabalho, a coleta de seringueiras efetuada em só uma das populações estudadas representaria a variação genética existente em ambas, visto a semelhança genética existente. Está se considerando que esse é o módulo para a espécie, o que deve ser mais bem estudado.

A projeção de que outros seringais situados a distâncias maiores, representando novas populações, eventualmente, podem mostrar maiores níveis de diferenciação genética. Isto possibilita a coleta para a conservação de recursos genéticos de outras populações, situadas em uma mesma região de coleta. A análise dos

resultados indicam que, em coletas de seringueiras em seringais nativos, situados em área de terra-firme, deve ser considerada a distância entre os seringais.

BUCKLEY et alii (1988), com base nos coeficientes de Nei, também concluiu que a maior diversidade dentro das populações de castanha-do-Brasil tem grandes implicações na conservação dos seus recursos genéticos, já que grande parte da diversidade genética desta espécie, pode ser preservada dentro de uma ou de algumas populações.

Outro aspecto a destacar na coleta de seringueiras nativas é o fato dos melhoristas serem muito parciais ou tendenciosos. Isto é, a coleta é direcionada para plantas de alta produção de borracha. Com este procedimento os melhoristas primeiro selecionam, para depois multiplicar assexuadamente e avaliar os novos clones, visando identificar algum clone que reúna características favoráveis, passíveis de uma recomendação futura.

É admissível este procedimento, desde de que sejam adotados, como prioridades, o futuro cruzamento entre os clones primários de origem distintas, visando explorar, em maior intensidade, o vigor de híbrido. Os clones selecionados, adotando-se deste procedimento, seriam utilizados como materiais de plantio nas regiões onde, atualmente, não apresentam limitações ao seu cultivo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e discutidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. Os parâmetros de variabilidade estimados demonstram altos níveis de variação genética para as duas populações de seringueira, sendo superiores à média de outras espécies arbóreas tropicais;

2. O grau de variabilidade estimado nas duas populações de seringueiras indica que a maior porção da variabilidade total encontra-se dentro da população;

3. Os parâmetros que medem a distância genética entre populações demonstram que as duas populações são muito semelhantes, apresentando baixos valores para esses parâmetros;

4. As estimativas das taxas de fertilização cruzada da seringueira nas duas populações naturais estudadas, indicam uma tendência desta espécie pertencer ao grupo de plantas intermediárias, quanto ao sistema de cruzamento;

5. A quantidade de variabilidade encontrada dentro das populações, associada ao padrão de distribuição das plantas da espécie, permitem a proposição de novas

estratégias no melhoramento genético da seringueira;

6. Os resultados indicam que, na região estudada, a coleta de germoplasma de seringueira deve ser dirigida a uma população, com um maior número de indivíduos por população.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W.T. Application of isozymes in tree breeding. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. *Isozymes in plants genetics and breeding*: Part A. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1983. p. 381-400.
- ALBUQUERQUE, J.M. Segmento de botânica. In: CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEVEICULTURA, 3., Belém, 1978. Belém, FCAP, 1978. p. 1-8.
- ALLARD, R.W. *Principios do Melhoramento Genetico das Plantas*. São Paulo, Edgard Blucher, 1971. 381p.
- ALLARD, R.W. The mating system and microevolution. *Genetics*, Princeton, **79**: 115-26, 1975.
- ALLARD, R.W. Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. *Journal of Heredity*, Washington, **79**: 225-38, 1988.
- ANDERSON, R.L. & BANCROFT, T.A. *Statistical Theory in Research*. New York, McGraw-Hill, 1952. p.324.
- ANTONOVICS, J. Evolution in closely adjacent plant populations: VI. Manifold effects of gene flow. *Heredity*, London, **23**: 507-24, 1968.

- ASTHON, P.S. Speciation among in the light of recent evidence. *Biol. J. Linn. Soc. London*, 1: 155-96 , 1969.
- ASHTON, P.S. Biosystematics of tropical woody plants: a problem of rare species. In: GRAND, W.F., ed. *Plant biosystematics*. New York, Academic Press, 1984. p. 497-518.
- BAKER, H.G. Reproductive methods as factors in speciation in flowering plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 24: 177-91, 1959.
- BALDWIN, J.T. *Hevea*, a first interpretation. *Heredity*, London, 38: 54-64, 1947.
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*, Lancaster, 28: 85-92, 1974.
- BAWA, K.S. Breeding of tropical hardwoods: an evolution of underlying bases, current status and future prospect. In: BURLEY, J. & STYLES, B.T., ed. *Tropical Trees: Variation, Breeding and Conservation*. Academic Press, London, 1976. p. 43-60.
- BAWA, K.S. & KRUGMAN, S.L. Reproductive biology and genetics of tropical forest trees in relation to conservation and management. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON RAIN FOREST REGENERATION AND MANAGEMENT, Guri, 1986. 22p.
- BAWA, K.S. & OPLER, P.A. Dioecism in tropical forest trees. *Evolution*, Lancaster, 29: 167-79, 1975.

- BAWA, K.S.; PERRY, D.; GRAYUM, M.M. & CUVILLE, R.E.
Reproduction biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. *American Journal of Botany*, Columbus, 72: 346-56.
- BOUHARMONT, J. Recherches taxonomiques et caryologiques chez quelques especes du genere *Hevea*. *Ser. Sci. INEAC*, Brussels, 85:64, 1960.
- BOUHARMONT, J. Fecondation de l'ovule et development de la graine apres croisement et autopollinisation chez *Hevea brasiliensis* Muell. *Arg. Cellule*, 62: 119-30, 1962.
- BOUYCHOU, J.G. La biologie de L'Hevea. *Revue Generale des Caoutchoucs & Pastiques*. 40: 933-1001. 1969.
- BOUYCHOU, J.G. The origins of the Far-East rubber-tree. I: Introduction and distribution. *Revue Generale des Caoutchoucs & Plastiques*. 33: 730-5. 1956.
- BRASIL. SUDHEVEA. O genero *Hevea*, descrição das espécies e distribuição geográfica. Rio de Janeiro, 1971a, 57 p. (SUDHEVEA, Plano Nacional da Borracha. Anexo XI).
- BRASIL. SUDHEVEA. Melhoramento genético da seringueira. In: _____. *Plano Nacional da Borracha*. Anexo 11. Pesquisa e experimentação com a seringueira. Rio de Janeiro, 1971b. p. 15-36.
- BROWN, A.H.D. Isozymes, Plant Population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied of Genetics*, Berlin, 52: 145-57, 1978.
- BROWN, A.H.D. & WEIR, B.S. Measuring genetic variability in

- plant populations. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., ed. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding: Part A*. Elsevier, Amsterdam, 1983. 516p.
- BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M. ; APSIT, V.S.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, Humb. & Bonpl.; *Lecythidaceae*): 1. Genetic variation in natural populations. *Theoretical and Applied of Genetics*, Asheville, **76**: 923-28, 1988.
- BULLOCK, S.H. Breeding Systems in the Flora of a Tropical Deciduous Forest in Mexico. *Biotropica*, St. Louis, **17**: 287-301. 1985.
- CAMARGO, F.C. *Estudo das possibilidades do desenvolvimento da cultura da seringueira no Estado de São Paulo*. Rio de Janeiro, Governo do Estado de São Paulo, 1958.
- CHELIAK, W.M. & PITEL, J.A. Electrophoretic identification of clones in tremblingsaspen. *Canadian Journal of Forest Research*, Ottawa, **14**: 740-43, 1984.
- CHEVALLIER, M.H. Preliminary studies of genetic variability of the germplasm from 1981: Amazonian prospection. In: COLLOQUE EXPLOTATION-PHYSIOLOGIE ET AMELIORATION DE L'Hevea, Montpellier, 1984. Compte rendu. Montpellier, IRCA/GERDAT, 1984. p.453-61.
- CHEVALLIER, M.H. Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isozyme markers. *Journal of the Rubber Research Research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, **3**: 42-53, 1988.

- CHEVALLIER, M.H.; LEBRUN, P. & NORMAND, F. Approach to the genetic variability of germplasm using enzymatic markers. In: COLLOQUE EXPLOTATION-PHYSIOLOGIE ET AMELIORATION DE L'Hevea, Montpellier, 1984. Comptes Rendus. Montpellier, IRCA/GERDAT, 1984. p.365-376.
- CORNER, E.J.H. The evolution of tropical forests. In: HUXLEY, J.; HARDY, A.C. & FORD, E.C. (eds.) EVOLUTION AS A PROCESS. Allen and Unwin., London, 1954. p.34-46.
- CROME, F.H.J. & IRVINE, A.K. "Two bob each way": the pollination and breeding system of the Australian rain forest tree *Syzygium cormiflorum* (Myrtaceae). *Biotropica*, St. Louis, **18**: 115-25, 1986.
- DIJKMAN, M.J. *Hevea, thirty years of research in the for East*. Miami, University of Miami, 1951. 87 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. *Melhoramento Genético da Seringueira*. Manaus, EMBRAPA-CNPSD, 1989. 23p. (EMBRAPA-CNPSD. Documentos, 10).
- FEDOROV, A.A. The structure of the tropical rain forest and speciation in the humid tropics. *Journal of Ecology*, **54**: 1-11, 1966.
- FERREIRA FILHO, C. *Porque perdemos a batalha da borracha*. Manaus, Governo do Estado do Amazonas, 1965 373 p. (Série Euclides da Cunha). 373 p.
- FERWERDA, F.P. & WIT, F. Rubber: *Hevea brasiliensis* (Wild) Muell. In: FERWERDA, F.P. & WIT, F. ed., *Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Washington, 1969.

p. 427-58.

GAN, Y.Y.: ROBERTSON, F.W. & SOEPADMO, E. Isozyme variation in some rain forest trees. *Biotropica*, St. Louis, 13: 20-8, 1981.

GOMES, A.R.S.; VIRGENS FILHO, A. de C.; MARQUES, J.R.B. & SANTOS, P.M. dos. Avaliação de clones de seringueira (*Hevea* sp) no sul da Bahia. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE RECOMENDAÇÕES DE CLONES DE SERINGUEIRA, 1, Brasília, 1982. *Anais*. Brasília, EMBRAPA-DDT, 1983. p.139-58.

GOMES, J.I. Estudo anatômico do xilema secundário das espécies de *Hevea* da Amazônia brasileira. Curitiba, 1981, 205p. (Mestrado - Universidade Federal do Paraná).

GONÇALVES, P.S. Expedição Internacional à Amazônia no Território Federal de Rondônia para coleta de material Botânico de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Manaus, EMBRAPA-CNPDS, 1981. 60p. (EMBRAPA-CNPDS. Relatório de viagem).

GONÇALVES, P.S.; PAIVA, J.R. de & SOUZA, R.A. de. *Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (Hevea spp) no Brasil e em países asiáticos*. Manaus, EMBRAPA-CNPDS, 1983. 69 p. (EMBRAPA.CNPDS. Documento, 2).

GONÇALVES, P.S.; CARDOSO, M. & ORTOLANI, A.A. Origem, variabilidade e domesticação da *Hevea*: uma revisão. *Pesquisa Agropecuária brasileira*, Brasília, 22: 135-56,

1990.

- HAMRICK, J.L. The distribution of genetics variation within and among natural populations. In: SHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M. & THOMAS, W. L.: ed. *Genetic and Conservation*. Menlo Park, The Benjamin/Cummings, 1983.p-335-48.
- HAMRICK, J.L. Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations. In: SOLTIS ,D.E. & SOLTIS, P.S. ed., *Isosymes in plant biology*. Portland. Dioscorides Press, 1989. pp. 87-105.
- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees procedures and preliminary results. *Biotropica*, Saint Louis, **18**: 201-7, 1986.
- HARIHAR, G. & YEANG, H.Y. The low fruit set that follows conventional hand pollination in *Hevea brasiliensis*: Insufficiency of pollen as a cause. *Journal of Natural Rubber Research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, **32**(1): 20-29, 1984.
- HO, C.Y. Contributions to improve the effectiveness of breeding, selection and planting recommendations of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Ghent. Belgium, 1979. 341p. (Doutorado - Faculty of Agricultural Sciences).
- IMLE, E.P. *Hevea Rubber: past and future*. *Economic Botany*, **32**: 264-77, 1978.
- INSTITUTE DE RECHERCHES SUR LE CAOUTCHOUC. Laboratoire d'électrophorèse. In: _____. Rapport Annuel: 1984.

- Paris, IRCA, 1985 p. 31-2.
- INSTITUTE DE RECHERCHES SUR LE CAOUTCHOUC. Laboratoire d'électrophorèse. In: _____ Rapport Annuel: 1985. Paris, IRCA, 1986, p. 33-5.
- INSTITUTE DE RECHERCHES SUR LE CAOUTCHOUC. Laboratoire d'électrophorèse. In: _____ Rapport Annuel: 1986. Paris, IRCA, 1987, p. 29-30.
- JACOB, J.L.; RIBAILLER, D. & D'AUZAC, J. Le NADP - phosphatase du latex d'*Hevea brasiliensis*: Inhibition interférence sur l'anabolisme isoprénique. *Physiol. Veget.* 8: 247, 1970.
- JACOB, J.L. & D'AUZAC, J. La glyceral dehydrogène - 3 - phosphatedeshydrogenase du latex d'*Hevea brasiliensis*. Comparaison avec son homologue phosphorylante. *European Journal Biochemistry*, 31: 255-65, 1972.
- JAIN, S.K. & BRADSHAW, A.D. Evolutionary divergence among adjacent plant populations: The evidence and its theoretical analysis. *Heredity*, London, 21: 207-441, 1966.
- JANZEN, D.H. Euglossine bees as long-distance pollinations of tropical plants. *Science*, Washington, 171: 203-5, 1971.
- KAGEYAMA, P.Y. Genetic structure of tropical tree species of Brazil. In: BAWA, K.S. & HADLEY, M. ed., *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants*. Paris. UNESCO. 1990. cap.26, p. 375-87.

- KAGEYAMA, P.Y. & DIAS, I. The application of genetic concepts to native forest species in Brazil. In: *Forest Genetic Resources*. Information n° 13. FAO, Rome, 1985. p.2-11.
- KAGEYAMA, P.Y.; NAMKOONG, G. & ROBERDS, J. Genetic diversity in species of tropical forests in the state of São Paulo - Brazil. 1992. (no prelo).
- LEBRUN, P. & CHEVALLIER, M.H. Starch and polyacrylamide gel electrophoresis of *Hevea brasiliensis*: a laboratory manual. Montpellier, IRCA/CIRAD, 1988. 44p.
- LI, C.C. *Population Genetics*. Chicago, The University of Chicago. Press. 1955. 366 p.
- LIU, E.H. & GODT, M.J.W. The differentiation of populations over short distance. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MacBRYDE, B. & THOMAS, W.L. (ed.). *Genetic and Conservation*. Menlo Park, The Benjamin/Cummings, 1983. p.78-95.
- MAJUNDER, S.K. Chromosome studies of some species of *Hevea*. *Journal of Natural Rubber Research Institute of Malaya*, Kuala Lumpur, 18:269-75, 1964.
- MARCON, G. Estrutura genética de populações de *Stylosantes humilis* H.B.K. (*Leguminosae*) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, 1988. 179p. (Doutorado- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ USP.).
- MENDES, L.O.T. Investigações preliminares sobre a

- duplicação do número de cromossomos da seringueira pela ação da colchicina. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*, Belém, 7: 1-60, 1946.
- METTLER, L. E. & GREGG, T. G. *Genética de Populações e Evolução*. São Paulo, Polígono/EDUSP, 1973. 262p.
- MORAES, V.H.F. Rubber. In: ALVIM, P.T. & KOZLOWSKY, T.T. *Ecophysiology of tropical crops*, New York, Academic Press, 1977. p. 315-31.
- MORAES, V.H.F. Fisiologia - Parte I. In: CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEVEICULTURA, 7., Belém, 1980. FCAP, 1980. 50p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Managing Global Genetic Resources. Structure of genetic variation. In: . *Forest trees*. Washington, National Academy, 1991. Cap. 3, p.51-72. (Managing Global Genetic Resources).
- NEI, M. Genetic distance between population. *American Naturalist*, Lancaster, 106: 283-92, 1972.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding National Academic Science*. 70: 3321-23, 1973.
- NEI, M. *Molecular Populations Genetics and Evolution*. Amsterdam, North-Holland, 1975.
- NEI, M. F-statistics and analyses of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-33. 1977.

- O'MALLEY, D.M. & BAWA, K.S. Mating system of a tropical rain forest tree species. *American Journal of Botany, Columbus*, **74**(8): 1143-49. 1987.
- O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.: *Lecythidaceae*): 2. Mating System. *Theoretical and Applied of Genetics*, Asheville. **76**: 929-32, 1988.
- ONG, S.H. Chromosome morphology at the pachytene stage in *Hevea brasiliensis*: a preliminary report. In: INTERNATIONAL RUBBER CONFERENCE, Kuala Lumpur, 1975. *Proceedings*. v. 2 p. 3-12.
- PAIVA, J.R. Estimativas de parâmetros genéticos em seringueira (*Hevea sp.*) e perspectivas de melhoramento. Piracicaba, 1980. 92p. (Mestrado- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP).
- PAIVA, J.R. I coleta de material sexuado e assexuado em seringais nativos do Estado de Mato Grosso. Manaus, EMBRAPA-CNPDS, 1981. 26p. (EMBRAPA-CNPDS. relatório).
- PAIVA, J.R. & GONÇALVES, P.S. Considerações preliminares do desempenho de clones de seringueira em Manaus. Estudos em desenvolvimento. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE RECOMENDAÇÕES DE CLONES DE SERINGUEIRA, 1, Brasília, 1982. Anais. Brasília, EMBRAPA-DDT, 1983. p. 173-82.
- PAIVA, J.R. & GONÇALVES, P.S. Eficiência do programa de melhoramento da seringueira no Centro Nacional de

Pesquisa de Seringueira e Dendê: Nove anos de pesquisa. Manaus, EMBRAPA-CNPDS, 1989. 41p. (EMBRAPA/CNPDS - Boletim de pesquisa 2.)

PAIVA, J.R.; TEIXEIRA, L.O.A.; VALOIS, A.C.C. & GONÇALVES, P.S. Aproveitamento dos recursos genéticos da seringueira. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1, Belém, 1984. *Anais*. Brasília, EMBRAPA-DDT, 1986. v.4. p. 105-12.

PERRY, B.A. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. *American Journal of Botany*, Columbus, 30: 527-43, 1943.

PIANKA, E.R. *Evolutionary ecology*. New York, Harper & Row, 1983. 486p.

PINHEIRO, F.S.V. & ALVES, R.M. Comportamento de clones de seringueira em algumas localidades do Pará e Maranhão. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE RECOMENDAÇÕES DE CLONES DE SERINGUEIRA, 1. Brasília, 1982. *Anais*. Brasília, EMBRAPA-DDT, 1983. p. 159-72.

PIRES, J.M. Revisão do gênero *Hevea*, descrição das espécies e distribuição geográfica. In: INSTITUTO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO NORTE, Belém, PA. *Relatório Anual Junho/1972 - Julho/1973. Projeto Botânica. Subprojeto - Revisão do gênero Hevea*. Belém, SUDHEVEA/DNPEA/IPEAN, 1973 p. 6-66.

PIRES, J.M. Notas de Herbário I (*Hevea camargoana* n. sp.). *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi. Série (Botânica)*.

- Belém, 52: 1-11, 1981.
- POLHAMUS, L.G. Plant improvement in *Hevea*. In: ———. *Rubber, botany, production and utilization*. London, Leonard Hill Books, 1962. p. 77-90.
- RAMAER, H. Cytology in *Hevea*. *Genética*, 17: 193-236, 1938.
- RITLAND, K. & JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, London, 47: 35-52, 1981.
- ROSS, J.M. & BROOKSON, G.W. Progress of breeding investigations with *Hevea brasiliensis*: III. Further data on the crosses made in the years 1937-1941. *Journal of the Rubber research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, 9(3): 158-72, 1960.
- SANTOS, M.M. Polimorfismo isoenzimático de populações subespontânea de Dendê (*Elaeis guineensis* Jacq) do Estado da Bahia e sua relação genética com seis procedências africanas. Ribeirão Preto, 1991. 105p. (Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP).
- SEIBERT, R.J. A study of *Hevea* in the Republic of Peru. *Ann. Mo. Bot. Garden.*, 34: 261-357, 1947.
- SERINGUEIRA. In: São Paulo. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária. *Programa Integrado de Pesquisa. Plantas Tropicais*. São Paulo, 1985. p.8-12.
- SCHULTES, R.E. Wild *Hevea*: An untapped source of

- germoplasm. *Journal Rubber Research Institute of the Sri Lanka*. **54**: 227-57, 1977.
- SHARP, C.C.T. Progress of breeding investigations with *Hevea brasiliensis*. The Philmoor crosses 1928-1931 series. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, **10**: 34-66, 1940.
- SHARP, C.C.T. Progress of breeding investigations with *Hevea brasiliensis*. 2. The crosses made in the years 1937-1941. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, **13**: 73-99, 1951.
- SHIMIZU, J.Y.; KAGEYAMA, P.Y. & HIGA, A.R. Procedimentos e recomendações para estudos de progênies de essências florestais. Curitiba, EMBRAPA/URPFCS, 1982. 34p. (Documentos, n° 11).
- SIMMONDS, N.W. Rubber breeding. In: WEBSTER, C.C. & BAULDKWILL, W.J. *Rubber*. Singapore Loughman Scientific & Technical. 1989. 615p.
- SOLEILLE, B. Etude de la variabilite enzymatique chez *Hevea brasiliensis*. Paris, 1984. 134p. (Doutorado- Universite de Paris -SUD Centre D'Orsay).
- SWOFFORD, D.L. *Biosys*: Programa de Computador. Illinois, 1989.
- TAN, H. & SUBRAMANIAM, S. A five-parent diallel cross analysis for certain characters of young *Hevea* seedlings. In: INTERNATIONAL RUBBER CONFERENCE, Kuala Lumpur, 1975. *Proceedings*. Kuala Lumpur, RRIM. 1976.

v.2, p.13-26.

- TOWSEND JUNIOR, C.H.T. *Desenvolvimento de clones de Hevea do Brasil*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Departamento Nacional de Produção Vegetal, 1961. 18 p.
- VALOIS, A.C.C. Melhoramento genético da seringueira. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/CNPQ/FCAP. *Curso de especialização em heveicultura*, 3. Belém, 1978. 24 p.
- VALOIS, A.C.C. Expressão de caracteres em seringueira e obtenção de clones produtivos e resistentes ao mal-das-folhas. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasília, 18: 1015-20. 1983.
- VELOSO, M.G. A exportação de borracha na região dos formadores dos rios Arinos, Teles Pires (Norte de Mato Grosso). *Revista Brasileira de Geografia*, 4:377-406, 1952.
- WALUJONO, K. & SUSENO, P.A. Experiments with P.A.A. electrophoresis for *Hevea* clones identification. In: SYMPOSIUM INTERNATIONAL RUBBER RESEARCH BOARD, Puncak, Indonesia, 1979.
- WARMKE, H.E. Studies on pollination of *Hevea brasiliensis* in Puerto Rico. *Science*, Washington, 113: 646-8, 1951.
- WARMKE, H.E. Studies on natural pollination of *Hevea brasiliensis* in Brazil. *Science*, Washington, 116: 474-5, 1952.
- WEIR, B.S. *Genetic data Analysis: Methods for discrete*

- populations genetic data. Suderland Sinauer Associates, 1990. 377p.
- 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. In: *Variability within and among natural populations*. Chicago, University of Chicago Press, 1978. 4.
- WYCHERLEY, P.R. The genus *Hevea*. In: WORKSHOP ON INTERNATIONAL COLLABORATION *Hevea* BREEDING AND THE COLLECTION AN ESTABLISHMENT OF MATERIALS FROM THE NEOTROPIC, 1977. Kuala Lumpur, 1977, 12 p.
- YEET, Y.H.; GHANDIMATHI, M. & PARANTHY, K. Protein and enzyme variation in some *Hevea* cultivars. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, 25: 9-18, 1977.

TABELA 6. Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / famílias/população, genes/ indivíduo/família/população no modelo hierárquico desbalanceado para cinco alelos do LAP-1 identificados por eletroforese em duas populações de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

F. V.	G.L.	A L E L O S				
		1	2	3	4	5
Populações	1	1,5902	0,0337	0,0111	0,5058	0,2227
Famílias	51	1,1989	0,3747	0,3028	0,1357	0,2427
Indivíduos	966	0,1160	0,0374	0,0410	0,0321	0,0342
Genes	1017	0,1170	0,0329	0,0369	0,0369	0,0433

TABELA 7. Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo/famílias/ população, genes / indivíduo/família/população no modelo hierárquico desbalanceado para quatro alelos do LAP-2 identificados por eletroforese em duas populações de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

F. V.	G.L.	A L E L O S			
		1	2	3	4
Populações	1	0,6034	$2,01.10^{-3}$	0,0012	0,5876
Famílias	51	0,7322	$9,54.10^{-4}$	0,0499	0,5840
Indivíduos	908	0,0953	$1,04.10^{-3}$	0,0192	0,0884
Genes	959	0,0876	$1,04.10^{-3}$	0,0109	0,0756

TABELA 8. Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / famílias/população, genes/ indivíduo/família/população no modelo hierárquico desbalanceado para cinco alelos do SKDH identificados por eletroforese em duas populações de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

F. V.	G.L.	A L E L O S				
		1	2	3	4	5
Populações	1	1,0299	0,0268	0,2354	0,9155	0,1440
Famílias	51	1,0869	0,6277	0,5097	0,3540	0,0597
Indivíduos	799	0,2600	0,2231	0,1066	0,0548	0,0144
Genes	852	0,1872	0,1379	0,0898	0,0440	0,0106

TABELA 9. Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo/famílias/ população, genes / indivíduo/família/população no modelo hierárquico desbalanceado desbalanceado para três alelos do MDH-1 identificados por eletroforese em duas populações de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

F. V.	G.L.	A L E L O S		
		1	2	3
Populações	1	2,2227	0,1814	1,1340
Famílias	51	0,1053	0,0357	0,0566
Indivíduos	936	0,0319	0,0116	0,0229
Genes	987	0,0238	0,0051	0,0187

TABELA 10. Estimativas das variâncias entre populações (σ_P^2), entre famílias/população (σ_F^2), entre indivíduo /família/população (σ_I^2), entre genes/ indivíduo/família/população (σ_G^2), da variância total (σ_T^2) para 17 alelos em quatro locos identificados por eletroforese em duas populações naturais de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	ALELOS	σ_P^2	σ_F^2	σ_I^2	σ_G^2	σ_T^2
LAP-1	1	$3,7.10^{-4}$	0,0282	$-5,0.10^{-4}$	0,1170	0,1451
	2	$-3,4.10^{-4}$	$8,8.10^{-3}$	$2,2.10^{-3}$	0,0329	0,0436
	3	$-2,9.10^{-4}$	$6,8.10^{-3}$	$5,2.10^{-3}$	0,0305	0,0423
	4	$3,6.10^{-4}$	$2,7.10^{-3}$	$-2,4.10^{-3}$	0,0369	0,0376
	5	$-2,3.10^{-5}$	$5,4.10^{-3}$	$-4,5.10^{-3}$	0,0433	0,0442
	$\bar{M}$	$2,3.10^{-5}$	0,0104	0,0000	0,0521	0,0625
LAP-2	1	0,1089	0,0176	0,0038	0,0876	0,1089
	2	$9,2.10^{-7}$	$-2,5.10^{-6}$	$2,5.10^{-7}$	$1,1.10^{-3}$	$1,1.10^{-3}$
	3	$-5,1.10^{-5}$	$8,5.10^{-4}$	$4,1.10^{-3}$	0,0109	0,0158
	4	$-6,3.10^{-6}$	0,0137	0,0064	0,0756	0,0957
	$\bar{M}$	$-4,0.10^{-5}$	$6,4.10^{-3}$	$2,9.10^{-3}$	0,0350	0,0443
SKDH	1	$-1,0.10^{-4}$	0,0257	0,0364	0,0187	0,2492
	2	$-7,2.10^{-4}$	0,0126	0,0426	0,0138	0,1924
	3	$-3,4.10^{-4}$	0,0125	0,0084	0,0898	0,1104
	4	$6,5.10^{-4}$	0,0093	0,0054	0,0440	0,0594
	5	$9,7.10^{-5}$	0,0014	0,0019	0,0106	0,0140
	$\bar{M}$	$-8,3.10^{-5}$	0,0123	0,0189	0,0939	0,1250
MDH-1	1	$2,2.10^{-3}$	$2,0.10^{-3}$	$4,1.10^{-3}$	0,0238	0,0320
	2	$1,5.10^{-4}$	$6,5.10^{-4}$	$3,3.10^{-3}$	0,0051	$9,1.10^{-3}$
	3	$1,1.10^{-3}$	$9,0.10^{-4}$	$2,1.10^{-3}$	0,0187	0,0228
	$\bar{M}$	$1,1.10^{-3}$	$1,2.10^{-3}$	$3,1.10^{-3}$	0,0159	0,0213
MÉDIA GERAL		$1,8.10^{-4}$	$8,7.10^{-3}$	$6,4.10^{-3}$	0,0545	0,0697

TABELA 11. Estimativas dos coeficientes de endogamia das plantas nas populações ($\hat{F}$) e dentro das populações ($\hat{f}$), do parentesco dentro das famílias ($\hat{\theta}_1$), da distância genética entre populações ($\hat{\theta}_2$), da taxa de fertilização cruzada ($\hat{t}$) para 17 alelos e quatro locos identificados por eletroforese em duas populações naturais de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	ALELOS	$\hat{F}$	$\hat{f}$	$\hat{\theta}_1$	$\hat{\theta}_2$	$\hat{t}$
LAP-1	1	0,1937	0,1914	0,1971	0,0028	0,6787
	2	0,2454	0,2512	0,1938	-0,0078	0,5985
	3	0,2790	0,2835	0,1549	-0,0063	0,5582
	4	0,0186	0,0081	0,0824	0,0106	0,9839
	5	0,0205	0,0210	0,1223	-0,0005	0,9589
	$\bar{M}$	<u>0,1664</u>	<u>0,1664</u>	<u>0,1664</u>	<u>0,0000</u>	<u>0,7147</u>
LAP-2	1	0,1956	0,1967	0,1602	-0,0014	0,6713
	2	-0,0026	-0,0022	0,0024	0,0048	1,0044
	3	0,3122	0,3151	0,0495	-0,0042	0,5208
	4	0,2099	0,2099	0,1430	-0,0001	0,6530
	$\bar{M}$	0,2099	0,2099	0,1444	-0,0001	0,6530
SKDH	1	0,2489	0,2492	0,1029	-0,0004	0,6010
	2	0,2832	0,2859	0,0617	-0,0037	0,5553
	3	0,1867	0,1892	0,1106	-0,0031	0,6818
	4	0,2588	0,2507	0,1678	0,0109	0,5991
	5	0,2433	0,2380	0,1076	0,0069	0,6155
	$\bar{M}$	0,2488	0,2494	0,0976	-0,0008	0,6008
MDH-1	1	0,2555	0,2018	0,1288	0,0672	0,6641
	2	0,4422	0,3998	0,0868	0,0707	0,4287
	3	0,1798	0,1384	0,0876	0,0480	0,7569
	$\bar{M}$	0,2535	0,2116	0,1080	0,0531	0,6502
MÉDIA GERAL		0,2181	0,2161	0,1270	0,0025	0,6446

TABELA 12. Frequência de 17 alelos em 2 populações naturais de seringueira (POP 1 e POP 2) e número de indivíduos / loco (N) identificados por eletroforese em 2 populações naturais de seringueiras. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	ALELOS	POP 1	POP 2	MÉDIA
LAP-1	1	0,7968	0,8527	0,8251
	2	0,0498	0,0417	0,0457
	3	0,0418	0,0465	0,0442
	4	0,0548	0,0233	0,0388
	5	0,0568	0,0359	0,0462
	N	502	516	1018
LAP-2	1	0,8941	0,8586	0,8760
	2	0,0000	0,0020	0,0010
	3	0,0169	0,0154	0,0161
	4	0,0890	0,1240	0,1068
	N	472	488	960
SKDH	1	0,5619	0,5127	0,5370
	2	0,2560	0,2639	0,2600
	3	0,1381	0,1146	0,1262
	4	0,0393	0,0856	0,0628
	5	0,0048	0,0231	0,0141
	N	420	432	852
MDH-1	1	0,9328	1,0000	0,9681
	2	0,0192	0,0000	0,0091
	3	0,0480	0,0000	0,0228
	N	469	519	988

TABELA 13. Variabilidade genética em duas populações naturais de seringueira medida pelo tamanho médio da amostra/loco ($\bar{N}$), pelo número médio de alelos /loco (A), pela proporção de locos polimórficos (P), pela heterozigidade média observada (H_o) e esperada (H_e). Piracicaba, SP, 1991.

POPULAÇÃO	$\bar{N}^{(1)}$	A	$P^{(2)}$	H_o	H_e
1	465,0 (17,0)	4,0 (0,6)	100,0	0,252 (0,085)	0,319 (0,105)
2	487,8 (18,8)	4,3 (0,5)	75,0	0,229 (0,092)	0,295 (0,130)

(1) - Valores entre parenteses correspondem aos desvios padrões.

(2) - Um loco é considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum não exceder a 0,95.

TABELA 14. Frequência de heterozigotos observados (H_o) e esperados (H_e), e índice de fixação ($\hat{I}_F$) em 4 locos identificados por eletroforese em 2 populações naturais de seringueiras. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	POPULAÇÃO 1			POPULAÇÃO 2		
	H_o	H_e	$\hat{I}_F$	H_o	H_e	$\hat{I}_F$
LAP-1	0,301	0,355	0,152	0,220	0,266	0,174
LAP-2	0,136	0,193	0,295	0,208	0,246	0,157
SKDH	0,470	0,599	0,215	0,470	0,648	0,274
MDH-1	0,100	0,127	0,212	0,020	0,020	-0,008

TABELA 15. Qui-quadrado para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando o número observado (N_o) e esperados (N_e) de 17 alelos e quatro locos identificados por eletroforese em duas populações naturais de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	CLASSES ⁽¹⁾	POPULAÇÃO 1			POPULAÇÃO 2		
		N_o	N_e	X^2	N_o	N_e	X^2
LAP-1	A	329,0	317,7		394,0	378,1	
	B	140,0	162,6		98,00	129,9	
	C	32,00	20,70		27,00	11,10	
				9,70**			31,4**
LAP-2	A	389,0	376,3		371,0	362,6	
	B	64,00	89,50		102,0	118,7	
	C	18,00	5,300		18,00	9,600	
				38,5**			9,81**
SKDH	A	155,0	131,7		142,0	112,9	
	B	160,0	206,6		159,0	217,2	
	C	104,0	80,70		133,0	103,9	
				21,4**			31,2**
MDH-1	A	414,0	408,1		497,0	497,0	
	B	47,00	53,80		10,00	9,900	
	C	8,000	2,100		0,000	0,100	
				19,2**			0,04 ^{ns}

(1): A - nº de homozigotos para o alelo mais comum;
 B - nº de heterozigotos entre os alelos comuns/raros;
 C - nº de homozigotos raros e outros heterozigotos.

** : $p < 0,01$;

ns - não significativo.

TABELA 16. Análise da heterogeneidade entre número observado (N_o) e esperado (N_e) de 17 alelos identificados em quatro locos por eletroforese em duas populações naturais de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	ALELOS	POPULAÇÃO 1		POPULAÇÃO 2		GL	χ^2
		N_o	N_e	N_o	N_e		
LAP-1	1	798,00	827,14	886,00	856,86	4	21,3**
	2	50,000	45,679	43,000	47,321		
	3	42,000	44,206	48,000	45,794		
	4	55,000	38,803	24,000	40,197		
	5	57,000	46,171	37,000	47,829		
LAP-2	1	842,00	825,47	844,00	860,53	3	7,24 ^{ns}
	2	0,0000	0,9790	2,0000	1,0210		
	3	16,000	16,157	17,000	16,843		
	4	84,000	99,390	119,00	103,61		
SKDH	1	470,00	448,47	443,00	464,53	4	29,5**
	2	215,00	219,08	231,00	226,92		
	3	116,00	105,61	99,000	109,39		
	4	33,000	52,559	74,000	54,441		
	5	4,0000	12,280	21,000	12,720		
MDH-1	1	875,00	902,92	1004,0	976,08	2	49,2**
	2	18,000	12,494	8,0000	13,506		
	3	45,000	22,585	2,0000	24,415		
TOTAL	17					13	107,2**

ns : não significativo;

** : $p < 0,01$.

TABELA 17. Estimativa do coeficiente de endogamia ($\hat{F}$), taxa de fertilização cruzada ($\hat{t}$) calculados a partir das frequências esperada ($\hat{H}_e$) e observada ($\hat{H}_o$) de heterozigotos para quatro locos identificados por eletroforese em duas populações naturais de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

POPU- LAÇÃO	PARA- METRO	L O C O S				MÉDIA
		LAP-1*	LAP-2	SKDH	MDH-1	
1	$\hat{H}_e$	0,3550✓	0,1928✓	0,5988✓	0,1271✓	-
	$\hat{H}_o$	0,3053✓	0,1359✓	0,4702✓	0,1003✓	-
	F	0,1400	0,2951	0,2148	0,2108	0,1930
		(0,0374)	(0,0648)	(0,0374)	(0,0721)	-
	$\hat{t}$	0,7544	0,5443	0,6464	0,6518	0,6764
		(0,0574)	(0,0775)	(0,0510)	(0,0985)	-
2	$\hat{H}_e$	0,2658	0,2463	0,6478	0,0195	-
	$\hat{H}_o$	0,2197	0,2077	0,4702	0,0197	-
	F	0,1734	0,1567	0,2742	-0,0103	0,2134
		(0,0400)	(0,0548)	(0,0436)	(0,8193)	-
	$\hat{t}$	0,7044	0,7296	0,5696	1,0208	0,6483
		(0,0283)	(0,0412)	(0,0538)	(1,6729)	-
MÉDIA	$\hat{H}_e$	0,3109	0,2207	0,6252	0,0726	-
	$\hat{H}_o$	0,2598	0,1726	0,4701	0,0584	-
	F	0,1644	0,2179	0,2481	0,1956	0,2184
		(0,0288)	(0,0412)	(0,0257)	(0,0755)	-
	$\hat{t}$	0,7176	0,6422	0,6024	0,6728	0,6415
		(0,0424)	(0,0557)	(0,0173)	(0,1058)	-

* - Valores entre parenteses correspondem aos desvios padrões.

TABELA 18. Diversidade genética total (H_T), dentro da população (H_S), entre populações (D_{ST}) e proporção da diversidade entre em relação a total (G_{ST}) para 4 locos identificados por eletroforese em 2 populações naturais de seringueiras. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	N*	H_T	H_S	G_{ST}	D_{ST}
LAP-1	1020	0,3109	0,3096	0,0042	0,0013
LAP-2	962	0,2211	0,2206	0,0023	0,0005
SKDH	853	0,6253	0,6239	0,0022	0,0014
MDH-1	976	0,0726	0,0712	0,0193	0,0014
MEDIA	3811	0,3356	0,3351	0,0003	0,0001

* - Número total de plantas analisadas nas duas populações.

TABELA 19. Estimativas do índice de fixação (F_{is}), conforme WRIGHT (1978) para cada alelo/loco em duas populações naturais de seringueira. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	POPULAÇÃO	A L E L O S					MÉDIA
		1	2	3	4	5	
LAP-1	1	0,138	0,368	0,354	-0,020	0,014	0,152
	2	0,245	0,102	0,214	0,062	0,019	0,174
LAP-2	1	0,284	0,000	0,491	0,268	-	0,295
	2	0,140	-0,002	0,222	0,168	-	0,157
SKDH	1	0,225	0,230	0,200	0,148	-0,005	0,215
	2	0,267	0,333	0,168	0,291	0,268	0,274
MDH-1	1	0,200	0,434	0,136	-	-	0,212
	2	-0,010	-0,008	-0,002	-	-	-0,008

TABELA 20. Estimativas dos índices de fixação dentro da população ($\hat{F}_{IS}$) e para a espécie ($\hat{F}_{IT}$), e medida de diferenciação entre populações, conforme WRIGHT (1978), para cada alelo/loco em duas populações naturais de seringueiras. Piracicaba, SP, 1991.

LOCOS	$\hat{F}$	A L E L O S					MÉDIA
		1	2	3	4	5	
LAP-1	IS	0,185	0,247	0,280	0,005	0,016	0,161
	IT	0,189	0,247	0,281	0,012	0,019	0,164
	ST	0,006	0,000	0,000	0,007	0,003	0,004
LAP-2	IS	0,203	-0,002	0,355	0,211	-	0,217
	IT	0,206	-0,001	0,355	0,213	-	0,219
	ST	0,003	0,001	0,000	0,003	-	0,003
SKDH	IS	0,246	0,283	0,185	0,244	0,222	0,246
	IT	0,248	0,283	0,186	0,251	0,227	0,248
	ST	0,003	0,000	0,001	0,009	0,007	0,002
MDH-1	IS	0,172	0,304	0,131	-	-	0,182
	IT	0,190	0,306	0,150	-	-	0,198
	ST	0,022	0,002	0,022	-	-	0,018

FIGURA 1. Localização de duas populações de seringueiras nativas do Estado do Acre. Piracicaba, SP, 1992.

FIGURA 2. Zimogramas dos padrões eletroforéticos, representando 17 alelos de quatro locos dos três sistemas enzimáticos analisados e seus respectivos RM's de plântulas de seringueira. Piracicaba, SP, 1992.

FIGURA 3. Perfis das bandas isoenzimáticas encontradas na análise de plantas em duas populações naturais de seringueira.

FIGURA 4. Perfis das bandas isoenzimáticas encontradas na análise de plantas em duas populações naturais de seringueira.

FIGURA 5. Perfis das bandas isoenzimáticas encontradas na análise de plantas em duas populações naturais de seringueira.

APENDICE 1. Representações da soma de quadrados para população (SQ_P), família / população (SQ_F), indivíduo / família / população (SQ_I) e genes / indivíduo / família / população (SQ_G), dos coeficientes K_1 , K_2 , K_3 , f_i e f_{ij} obtidos das análises de variância no modelo hierárquico desbalanceado, conforme ANDERSON & BANCROFT (1952) e WEIR (1990). Piracicaba, SP.

1. Soma de Quadrados

$$a) C = \frac{Y^2_{....}}{n_{...}}$$

$$b) SQ_P = \frac{\sum_{i=1}^a Y^2_{i...}}{n_{i...}} - C$$

$$c) SQ_F = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} Y^2_{ij..}}{n_{ij.}} - \frac{\sum_{i=1}^a Y^2_{i...}}{n_{i...}}$$

$$d) SQ_I = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} Y^2_{ijk.}}{n_{ijk.}} - \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} Y^2_{ij..}}{n_{ij.}}$$

$$e) SQ_G = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y^2_{ijkl} - \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} Y^2_{ijk.}}{n_{ijk}}$$

$$f) SQ_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y^2_{ijkl} - C$$

onde:

$$n_{ijk} = 2 \text{ (número de genes por indivíduos)}$$

$$n_{ij.} = \sum_{k=1}^{c_{ij}} n_{ijk}$$

$$n_{i..} = \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} n_{ijk}$$

$$n_{...} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} n_{ijk}$$

$$Y_{ijk.} = \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}$$

$$Y_{ij..} = \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}$$

$$Y_{i...} = \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}$$

$$Y_{....} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}$$

2. Coeficientes

$$a) K_1 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij.}^2 \cdot f_{ij}$$

$$b) K_2 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij.}^2 \cdot f_i$$

$$c) K_3 = \sum_{i=1}^a n_{i..}^2 \cdot f_i$$

onde:

$$f_{ij} = \frac{\frac{1}{n_{ij.}} - \frac{1}{n_{i..}}}{\sum_{i=1}^a b_i - a}$$

$$f_i = \frac{\frac{1}{n_{i..}} - \frac{1}{n_{...}}}{a - 1}$$