**ESTRUTURA GENÉTICA POR ISOENZIMAS EM
POPULAÇÕES NATURAIS DE JACARANDÁ
PAULISTA (*Machaerium villosum* Vog.)**

JOÃO DEL GIUDICE NETO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **Paulo Yoshio Kageyama**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Ciências Florestais.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Junho - 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Giudice Neto, João Del

Estrutura genética por isoenzimas em populações naturais de Jacarandá Paulista
(*Machaerium villosum* Vog.) / João Del Giudice Neto. - - Piracicaba, 1999.
128 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Árvore florestal 2. Diversidade genética 3. Genética florestal 4. Isoenzima
vegetal 5. Jacarandá 6. População de plantas 7. Variabilidade genética 8. Vegetação
I. Título

CDD 634.973332

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Pedro e Laudelina, por terem sido os primeiros a acreditar em meus sonhos, antes de mim mesmo; e à Márcia Cristina, minha mulher, e Marina, minha filha, pelas maiores felicidades de minha vida.

AGRADECIMENTOS

As pessoas que seguem abaixo contribuíram tanto por seu tempo, energia, visão, profissionalismo, apoio e amizade de um modo especial e importante nesta etapa da minha vida. Palavras não podem expressar minha gratidão a elas, porém, uma pequena frase de uma antiga canção popular, acho que sintetiza tudo o que poderia ser dito neste momento: “...o apreço não tem preço”. À vocês, muito obrigado.

- Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, do Depto. de Ciências Florestais-ESALQ/USP, orientador deste trabalho;

- Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, coordenador do curso de pós-graduação em Ciências Florestais do LCF/ESALQ/USP;

- Prof. Dr. Roland Vencovsky, do Depto. de Genética e Melhoramento de Plantas-ESALQ/USP;

-Dr. Adauto Ivo Milanez, Dra. Lilian B. P. Zaidan, Dra. Rita de Cássia L. F. Ribeiro, Dra. Marcia I.M.S. Lopes e Dra. Marisa Domingos, dirigentes do Instituto de Botânica à época da realização deste trabalho;

-Dr. Marcos Mecca Pinto, diretor da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu do Instituto de Botânica;

-Dr. Eduardo Amaral Batista, diretor da Estação Experimental e Ecológica de Mogi Guaçu do Instituto Florestal;

-Marco Aurélio Nalon, físico da Divisão de Dasonomia do Instituto Florestal;

-Prof. Flavio Bertin Gandara, do Depto.de Botânica-ESALQ/USP;

-MSc. Alexandre Magno Sebbenn e MSc. Nadja Lepsch-Cunha do Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas-LARGEA/ESALQ/USP;

-Elza Martins Ferraz e Gelson Dias Fernandes, técnicos responsáveis do LARGEA/ESALQ/USP;

-Veridiana Oliveira dos Santos, estagiária do LARGEA/ESALQ/USP;

-Samuel Barnuevo, oficial de apoio à pesquisa da Reserva Biológica de Mogi Guaçu;

-Funcionários da Reserva Biológica de Mogi Guaçu;

-Colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais da ESALQ/USP.

Estendo meus agradecimentos ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e ao Instituto de Botânica, pela oportunidade e auxílio oferecidos.

“... alguns dados, nem todos, sem conclusões. Para os que me aceitam são inúteis ambos; os curiosos terão prazer em confrontar obras e dados. Aos que me rejeitam, trabalho inútil explicar o que antes de ler, já não aceitaram...”

Mário de Andrade

Errata

- 1) Na página VII, item RESUMO, linha 8 do 1^o parágrafo, onde se lê:
A análise isoenzimática revelou 15 alelos em dez locos polimórficos...
leia-se:
A análise isoenzimática revelou 27 alelos em dez locos polimórficos...
- 2) Na página VII, item RESUMO, após o 1^o parágrafo incluir:
As populações estudadas foram classificadas em “Modelo Natural – MN” e “Modelo Antrópico – MA”, conforme o grau de preservação das áreas. Na população MN, amostrou-se 31 indivíduos adultos (DAP igual ou maior que 10 cm) enquanto na população MA, 26 indivíduos adultos e 93 indivíduos jovens (limite de DAP inferior a 10 cm) foram amostrados. Na população MA, os indivíduos jovens estão dispostos agrupados, formando reboleiras a partir de alguns indivíduos adultos.
- 3) Na página IX, item SUMMARY, linha 7 do 1^o parágrafo, onde se lê:
The isoenzyme analysis revealed 15 alleles distributed in ten polymorphic loci ...
leia-se:
The isoenzyme analysis revealed 27 alleles distributed in ten polymorphic loci ...
- 4) Na página IX, item SUMMARY, após o 1^o parágrafo, incluir:
The populations were classified in “Natural Model – MN” and “Antropic Model - MA”, according to preservation condition of the areas. At MN population, 31 adult individuals (DBH equal or higher than 10 cm) were sampled, whereas at MA population, 26 adult and 93 young, individuals (DBH lesser than 10 cm) were assigned. At MA population, the young individuals were in cluster, shaping a descendent group from some adult individuals.
- 5) Na página 102, item CONCLUSÕES, após o 3^o parágrafo incluir:
Não detectou-se diferenças entre as populações Modelo Natural e Modelo Antrópico, quanto aos parâmetros genéticos estudados.
- 6) Na página 102, item CONCLUSÕES, 4^o parágrafo, onde se lê:
A correlação entre as populações foi em torno de 0,15, ...
leia-se:
O índice de fixação médio de genes dentro de indivíduos nas populações foi em torno de 0,15, ...

3.2.9.6 Fluxo gênico	55
3.2.9.7 Autocorrelação espacial	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Amostragem dos indivíduos	59
4.2 Os sistemas enzimáticos	60
4.3 Variabilidade genética intrapopulacional	65
4.4 Estrutura genética	76
4.5 Taxa de cruzamento	83
4.6 Fluxo gênico	85
4.7 Autocorrelação espacial	89
5 CONCLUSÕES	102
BIBLIOGRAFIA	103
APÊNDICE	117

ESTRUTURA GENÉTICA POR ISOENZIMAS EM POPULAÇÕES NATURAIS DE JACARANDÁ-PAULISTA (*Machaerium villosum* VOG.)

Autor: JOÃO DEL GIUDICE NETO

Orientador: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

RESUMO

Duas populações naturais de *Machaerium villosum* Vog. (Jacarandá-Paulista), espécie arbórea das florestas de planalto do sudeste brasileiro, foram estudadas por meio da eletroforese de isoenzimas visando determinar os níveis de variabilidade genética mantidos dentro das populações, sua estrutura genética, a taxa de cruzamento, o fluxo gênico e a estruturação espacial dos genótipos. As populações amostradas localizam-se na Fazenda Campininha, no município de Mogi Guaçu, SP, área pertencente a Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. A análise isoenzimática revelou 15 alelos em dez locos polimórficos em pelo menos uma das populações.

Os índices de diversidade estimados mostraram uma alta variabilidade genética da espécie. O polimorfismo (P) com limite de frequência igual ou inferior a 0,99 variou de 90,00% a 100,00% entre as populações. O número médio de alelos por loco (A) variou entre 2,40 e 2,70 e a diversidade genética medida pela heterozigosidade esperada média (H_e) variou entre 0,302 e 0,378, estando entre os mais altos valores das espécies arbóreas tropicais.

As populações de indivíduos adultos estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg enquanto que entre os indivíduos jovens a maioria dos locos não ajustou-se as pressuposições do equilíbrio. A variação dos resultados sugere a ocorrência de deriva associada aos efeitos de seleção no loco α -Est.

A estrutura genética revelou uma baixa divergência entre as populações ($F_{ST\ máx.} = 0,029$) indicando que a maior parte da variabilidade está dentro das populações. Os índices de fixação F_{IT} e F_{IS} foram em média de 0,15 ($F_{IT} = 0,175$, $F_{IS} = 0,151$ obtidos apenas de indivíduos adultos e $F_{IT} = 0,163$ e $F_{IS} = 0,146$ obtidos de indivíduos jovens e adultos). Estes valores devem-se principalmente a provável

seleção do loco α -Est. Quando este loco é excluído das médias, os índices de fixação populacionais reduzem-se significativamente ($F_{IT} = 0,085$, $F_{IS} = 0,062$ para os adultos e $F_{IT} = 0,074$ e $F_{IS} = 0,053$ para adultos e jovens).

A taxa de cruzamento foi obtida a partir da frequência dos heterozigotos obtendo-se valores de 0,738 e 0,745 para adultos e adultos mais jovens, respectivamente e 0,883 e 0,899 quando o loco α -Est é excluído do cálculo. O fluxo gênico medido pelo número de migrantes (N_m) foi alto, variando entre 2,09 para os adultos e 3,06 para jovens e adultos. A área de vizinhança foi obtida a partir de três densidades variando entre 1,32 ha e 213,80 ha, representando a área mínima a qual engloba indivíduos que trocam genes ao acaso.

As análises de autocorrelação espacial demonstraram que os genótipos distribuem-se aleatoriamente dentro das populações, não havendo estruturação espacial.

A alta diversidade da espécie aliada a adaptação a ambientes fragmentados, a tornam apta para aplicações em programas de conservação genética.

ISOENZYME GENETIC STRUCTURE IN NATURAL POPULATIONS OF JACARANDÁ-PAULISTA (*Machaerium villosum* VOG.)

Author: JOÃO DEL GIUDICE NETO

Adviser: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

SUMMARY

Two natural populations of *Machaerium villosum* Vog. (Jacarandá-Paulista), a woody species from Brazilian southeast plateau woodland, were studied by enzyme loci detected from starch gel electrophoresis aiming to determine the genetic variability levels within populations, their genetic structure, the outcrossing rate, the gene flow and the spatial distributions of genotypes. The sampled populations are situated in Campininha farm, at Mogi Guaçu county, in São Paulo State, area wich belong to Environment Department from São Paulo State. The isoenzyme analysis revealed 15 alleles distributed in ten polimorfic loci at least one of populations.

The estimated diversity index showed high variability genetic of the species. The polimorfism (P) with limit equal or lower than 0,99 of allelic frequency alternated 90,00% to 100,00% between populations. The average allele number per loci (A) alternated between 2,40 and 2,70 and the gene diversity measured by average expected heterozigosity (H_e) varied between 0,302 and 0,378, being the highest values among tropical woody species.

Adult populations were in Hardy-Weinberg equilibrium whereas the young individuals were not fitted to presupposed equilibrium for majority of their loci. The variation of these results suggests the occurrence of the drift associated to selection effects at α -Est.

Genetic structure revealed a short divergency between populations ($F_{ST\ máx.} = 0,029$) showing that great part of variability is within populations. Fixation index F_{IT} and F_{IS} were as a rule 0,15 ($F_{IT} = 0,175$, $F_{IS} = 0,151$ for adults only and $F_{IT} = 0,163$ and $F_{IS} = 0,146$ for young and adult individuals). These values may be due selection in the α -Est. When this loci is excluded from means, the population fixation index decreased significantly ($F_{IT} = 0,085$, $F_{IS} = 0,062$ for adults and

$F_{IT} = 0,074$ and $F_{IS} = 0,053$ for adults and young individuals).

The outcrossing rate was obtained from heterozygotes frequencies achieving 0,738 and 0,745 for adults only and adults with young, respectively, 0,883 and 0,899 for α -Est loci excluded. The gene flow measured by the migrants number (Nm) was high, changing from 2,09 for adults to 3,06 for young with adults individuals. Neighbouring area obtained from three densities changed from 1,32 ha to 213,80 ha, representing the minimum area with individuals exchange genes randomly.

Spatial autocorrelation analysis showed genotypes are randomly distributed within populations, hence there no spatial structure.

The high diversity of this species associated to adaptative capacity of the species to fragmented environment, become it able to genetic conservation programmes.

1. INTRODUÇÃO

A fragmentação das áreas naturais nos trópicos tem sido assunto de estudo, sobretudo pelos aspectos negativos que ela exerce sobre a biodiversidade. Dentre esses, cabem destaque à perda e extinção de espécies provocadas por redução de área, impedimento de migração, restrição do tamanho populacional e efeitos de borda (Alvarez-Buylla et al, 1996; Turner, 1996; Laurance et al., 1997).

Embora a cinética de extinção varie entre os diferentes taxa dentro do mesmo fragmento, imagina-se que as espécies arbóreas se tornem funcionalmente extintas bem antes de suas populações desaparecerem, sendo então denominadas “mortas vivas” (Janzen, 1986; Laurance et al., 1997). Assim ocorre, pois é amplamente disseminado que populações que experimentam redução no seu número de indivíduos tendem a sofrer deriva genética e endogamia, que diminuem a variação genética pelo aumento da homozigose e por consequência reduz o potencial adaptativo da população (*fitness*) (Barret & Kohn, 1991; Hedrick & Miller, 1992; Ellstrand & Elam, 1993; Frankham, 1995), havendo entretanto, quem afirme que pouca evidência há, a ponto de sugerir que a perda de heterozigosidade e diversidade alélica sejam uma força dirigida de extinção local em populações fragmentadas (Lande, 1988; Pimm et al., 1988).

A despeito da controvérsia, muitos estudos refletem a preocupação com o potencial genético das populações de espécies arbóreas tropicais, sobretudo em áreas fragmentadas, procurando reunir subsídios que contribuam para a conservação *in situ*, o manejo sustentado e a formação de áreas para coleta de sementes visando à recuperação de áreas degradadas.

Tendo um dos maiores níveis de biodiversidade do mundo, a Mata Atlântica, ecossistema conhecido da comunidade científica, é um representante das florestas tropicais mais ameaçado pelo processo de fragmentação. A maioria da cobertura

florestal remanescente está localizada sobre os topos de morro e encostas, com pouquíssima vegetação remanescente na região do planalto, em que a expansão agrícola resultou na perda de mais de 95% da floresta (DEPRN, 1991; SOS Mata Atlântica & INPE, 1993).

As matas de planalto, não obstante ser o ecossistema sob domínio da Floresta Atlântica que mais vêm sofrendo com o processo de fragmentação, pouca atenção têm recebido, apesar de sua importância e unicidade. Nessas matas, a maioria dos estudos focaliza-se na descrição florística e fitossociológica de manchas de florestas secundárias e pouco é despendido na obtenção de dados sobre a dinâmica associada ao processo de fragmentação florestal, tendo como consequência, uma baixa quantidade de informações biológicas que possa guiar programas de conservação nessa região (Viana & Tabanez, 1996).

Muitas espécies florestais desse bioma, sobretudo aquelas de maior apelo comercial, são interessantes do ponto de vista de conservação e manejo, à aplicação de estudos sobre a estrutura genética populacional, entretanto, devido a restrições práticas e econômicas impostas ao estudo de um grande número de espécies, tem-se procurado amostrar aquelas que o representem ou que sirvam de modelos para esse bioma. Dentre essas, o *Machaerium villosum* Vog, conhecido pelo nome vulgar de Jacarandá-paulista, mostra-se uma espécie adequada a um estudo do potencial genético de suas populações na Mata Atlântica de Planalto, visto ser um representante das espécies com distribuição ampla, reprodução majoritariamente alógama, dispersão anemocórica, polinização por abelhas e classificar-se entre os estágios finais da sucessão.

Sua ocorrência natural nos remanescentes florestais das matas de planalto, principalmente dos estados do sudeste brasileiro, é um motivo para seu uso em programas de formação de mudas utilizadas em recuperação de áreas degradadas, até o momento pouco disseminado, além de poder estabelecer-se áreas para a coleta de sementes geneticamente conhecidas. Associado a isto, as boas características de sua madeira, útil na confecção de vários artigos de marcenaria, podem estimular a busca de formas para manejar comercialmente a espécie.

Considerando-se que no papel de reconstrução de florestas, é importante que mantenha-se o nível de variabilidade genética encontrado nas populações naturais e desta maneira, para o bom manejo florestal torna-se imperioso saber o modo como

essa variabilidade está partilhada dentro das populações para que seus tamanhos não caiam abaixo do mínimo viável, o que comprometeria a perpetuação da espécie. Portanto, o estudo da estrutura genética de populações é uma ferramenta das mais úteis para se conseguir esses propósitos.

Assim, neste trabalho, duas populações naturais de *M. villosum* foram estudadas em sua estrutura genética a partir da eletroforese de isoenzimas.

Os objetivos foram determinar os níveis de variação genética mantidos dentro das populações naturais desta espécie, verificar como está partilhada a diversidade entre as populações e caracterizar sua estrutura genética. As estimativas dos parâmetros obtidas serão comparadas com as de outras espécies arbóreas tropicais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A espécie *Machaerium villosum* Vog.

O gênero *Machaerium* (*Machairion* - grego - pequeno cutelo, alusão à forma do fruto) pertence a família Leguminosae, sub-família Papilionoideae, a qual engloba cerca de 400 gêneros, sendo portanto, a maior entre as leguminosas (Hoehne, 1941; Joly, 1979).

Machaerium villosum Vog. é uma árvore freqüente no Brasil meridional, ocorrendo nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná, principalmente na floresta semidecídua de altitude, atingindo as árvores adultas alturas de até 30 metros (Hoehne, 1941; Lorenzi, 1992). Suas folhas chegam a 30 cm de comprimento, com folíolos alternados lanceo-oblongados, acuminados, no verso bastante alvo-lanulosos, pilosos quando novos, mais tarde acinzentados; inflorescências axilares, paniculadas, pendentes de 10-15 cm de comprimento, escuras na raque e nas flores enquanto em botão, depois da antese evidencia-se entretanto, o branco interno no meio dos pêlos seríceos-escuros; flores sésseis por fora e mesmo no dorso das asas e da carena seríceo-pilosas, escuras de 8-9 mm de comprimento; cálice campanulado, 10 estames, monadelfos; legumes de 7-11 cm de comprimento, na região seminífera pouco curvados, espessados e asa obovalada, obtusa de 2,5 cm de largura na parte superior, reticulada e glabra (Hoehne, 1941).

A coloração da madeira varia do pardo-claro-avermelhado ao pardo-violáceo escuro com raias ou manchas escuras, quase negras em certas amostras, às vezes arroxeadas, lisa, compacta, com odor fraco e agradável, muito pesada, dura e resistente à putrefação, sendo preferida na confecção de móveis luxuosos, balcões, lambris, caixilhos, tacos, esquadrias, compensados e dormentes, produzindo ainda lenha de boa qualidade (Andrade & Vecchi, 1916; Rizzini & Mors, 1976; Nogueira, 1977).

A floração da espécie ocorre nos meses de outubro-dezembro e os frutos

amadurecem de julho-setembro, porém, a produção de sementes é irregular e escassa, ocorrendo em abundância somente a cada 2-3 anos (Nogueira, 1977; Lorenzi, 1992).

O habitat preferencial da espécie não chega a ser consensual. Nogueira (1977) afirma que o *M. villosum* ocorre freqüentemente a céu aberto, sendo um evento raro encontrar-se plantas jovens espalhadas pela mata. Sob condições de plantio heterogêneo realizado por este autor, o crescimento da espécie é considerado lento.

Há quem afirme que a espécie apresenta uma densidade relativa maior em mata ciliar do que em terra firme (Bertoni et al., 1982), outros apontam a preferência da espécie por áreas que não sofrem influência das cheias (Mantovani et al., 1989). É possível que ambos estejam certos.

À luz dessa questão, os trabalhos de Batista (1988) e Batista & Couto (1992a, 1992b) mostraram que as variáveis biométricas altura, diâmetro, área basal e volume cilíndrico do *M. villosum* correlacionaram-se positivamente com os fatores físicos e químicos do solo, principalmente frações de argila e areia fina e o macroelemento potássio (K).

Outro dado relevante para o estudo de dinâmica populacional é a distribuição espacial ao nível local, ou seja, como estão distribuídos os indivíduos dentro das populações.

A tabela 1 apresenta alguns levantamentos fitossociológicos realizados na área de ocorrência do *M. villosum*, sobretudo os Estados de Minas Gerais e São Paulo. Nesta tabela é dada ênfase aos parâmetros fitossociológicos do *M. villosum*.

Os dados fitossociológicos devem ser observados com cuidado, quando o objetivo é realizar inferências sobre a dinâmica, sobretudo a espacial das espécies arbóreas tropicais. Isto porque, os diversos estudos usam diferentes limites de inclusão de indivíduos em suas amostragens e ainda o tamanho da área amostrada varia consideravelmente entre os trabalhos.

Embora as deficiências desses levantamentos para o propósito em questão sejam relevantes, algumas considerações podem ser feitas a partir da amostragem dos trabalhos compilados na tabela 1.

Para estas considerações pode-se utilizar dois parâmetros simples, o número de indivíduos amostrados da espécie e sua freqüência absoluta. O primeiro vem da

Tabela 1. Levantamentos fitossociológicos realizados em áreas de ocorrência natural de *Machaerium villosum* Vog. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.
FA = Frequência absoluta

Local	Altitude (m)	Vegetação	Área levantada (m ²)	n° ind.	FA	Método	Fonte
Bauru/SP	570	M.Mesófila	—	—	—	Quadrantes	Cavassan et al (1984)
Brasília/DF	1100	M.ciliar	30200	—	—	Parcelas	Felfili (1994)
Brotas/SP	535	—	3000	1	—	Parcelas	Salis et al (1994)
Lindóia/SP	720	M.ciliar	2200	1	9,09	Parcelas	Toledo Filho et al (em prep.) ¹
Lindóia/SP	760	M.Mesófila	2200	1	9,09	Parcelas	Toledo Filho et al (em prep.) ¹
Jaboticabal/SP	565-580	M.Mesófila	12800	—	—	Parcelas	Pinto (1989)
Jundiaí/SP	870-1170	M.Planalto M.altitude	4200	1	8,33	Parcelas	Rodrigues et al (1989)
Lavras/MG	925	—	50400	15	9,52	Parcelas	Oliveira Filho et al (1994)
Lavras/MG	~1000	—	4800	—	—	Parcelas	Oliveira Filho et al (1994)
M.Guaçu/SP	600	Cerrado	49800	80	19,28	Parcelas	Batista (1982)
M.Guaçu/SP	600	M.ciliar	—	—	—	Quadrantes	Gibbs et al (1980)
Rio Claro/SP	630	M.Mesófila	—	7	2,33	Quadrantes	Pagano et al (1987)
Sta.Rita P.Quatro/SP	560-620	M.Mesófila	17600	21	45,45	Parcelas	Vieira et al (1989)

¹ TOLEDO FILHO, D.V. et al. (Instituto Florestal, São Paulo, SP). Fitossociologia de um fragmento florestal nas margens do Rio do Peixe, município de Lindóia, SP. (em elaboração)

mera contagem de indivíduos na amostra, enquanto o segundo é o quociente do número de unidades amostrais em que a espécie aparece pelo número total de unidades amostrais (parcelas ou quadrantes), expresso em porcentagem. Assim, esse número atinge valor máximo (100%) se em todas as unidades amostrais pelo menos um indivíduo for amostrado.

Pela observação da tabela 1 vê-se que não há uma correlação clara entre tamanho amostral e número de indivíduos, pois se considerar apenas os trabalhos com área superior a um hectare (incluindo aí os trabalhos feitos pelo método de quadrantes) percebe-se que a área amostrada, tanto pode abrigar a espécie em um número elevado quanto pode também não abrigar nenhum indivíduo da espécie. Ora, isso pode ser um indicativo de agrupamento dos indivíduos da espécie.

Corroborar para isto ainda, a análise da frequência absoluta. A frequência absoluta média dos trabalhos compilados para essa espécie situa-se na faixa dos 9%. Porém, o fato mais evidente vem do levantamento de Mogi Guaçu feito por Batista (1982), em que 19,28% das unidades amostrais contiveram todos os indivíduos da amostra (80). Os dados de Rio Claro também mostram uma tendência ao agrupamento.

Martins (1979) afirma que a frequência absoluta de espécies arbóreas pelo método de parcelas é afetada pelo tamanho, forma, número e tipo de distribuição espacial das parcelas. Assim, mais uma vez ressalta-se o cuidado nas comparações feitas acima.

Embora o método de parcelas forneça a área amostrada, Martins (1979) pontua que pelo método dos quadrantes, devido as suas necessidades, conhece-se uma área de floresta em estudo, maior do que a que seria por parcelas.

Assim, na tabela 1, os trabalhos feitos por quadrantes, embora não permitam o cálculo da área, pressupõe-se uma porção significativa da floresta.

A discussão da distribuição espacial tem sentido, pois por meio dela pode-se chegar a densidade populacional e classificar as espécies em comuns e raras. Estes conceitos têm fundamental importância no manejo racional e conservação das espécies arbóreas tropicais. Neste sentido, Kageyama & Gandara (1993) afirmam que enquanto as espécies comuns são mais facilmente controláveis quanto ao seu manejo, as raras por apresentarem baixíssima densidade, têm uma implicação muito significativa sob o ponto de vista genético de suas populações. Para estes autores, as

espécies raras devem ser as mais importantes para a definição de tamanhos de reservas genéticas.

A definição de espécie rara varia conforme o estudo. Hubbel & Foster (1986), por exemplo, consideraram rara a espécie com densidade média de menos de um indivíduo por hectare. No estudo de Hamrick & Murawski (1991) o limite para a raridade foi até quatro indivíduos coespecíficos por hectare. Qualquer dos dois limites adotados representam um número muito baixo quando comparados com o número de indivíduos por hectare na floresta tropical.

Tão importante quanto a definição de espécie rara para os estudos de genética populacional é saber o tipo de raridade.

Bawa & Ashton (1991) distinguem quatro categorias de raridade na floresta tropical:

- 1) Das espécies que são uniformemente raras;
- 2) Das espécies que são comuns em alguns locais mas, rara entre eles;
- 3) Das espécies localmente endêmicas e
- 4) Das espécies agrupadas, que podem ocorrer em altas densidades mas a densidade populacional global é muito baixa.

Considerando o *M. villosum* como um modelo de distribuição agrupada, é possível que esta espécie se comporte como a quarta categoria. Do ponto de vista genético, as consequências deste tipo de raridade dependem do tamanho dos agrupados, o tempo sobre o qual o pequeno tamanho populacional persiste nos agrupados e o total de fluxo gênico entre os agrupados (Bawa & Ashton, 1991).

Pela classificação de Budowski (1965, 1970), *M. villosum* encontra-se entre as espécies dos estágios sucessionais finais, podendo ser incluída, segundo Ferreti et al. (1995), no grupo das secundárias tardias.

A espécie é pouco caracterizada em aspectos como a biologia floral, modo de reprodução e sistema de cruzamento, não tendo sido encontrados trabalhos específicos sobre estes assuntos. Contudo, algumas relações são aqui feitas ao nível da sub-família que a compreende.

Acredita-se que o modo principal de reprodução da espécie seja via sexuada, embora Nogueira (1977) aponte que é característica da planta rebrotar de raízes, formando reboleiras de plantas pequenas, onde outrora havia uma árvore.

Arroyo (1981) diz que em uma comparação de auto-incompatibilidade entre

as três sub-famílias de Leguminosae, ela é proporcionalmente menos freqüente entre as Papilionoideae. Contudo, neste grupo há uma tendência global de uma freqüência maior de auto-incompatibilidade (SI) entre as plantas arbóreas que em grupos herbáceos. Informação semelhante também é dada pela revisão de Gibbs (1990) sobre sistemas auto-incompatíveis, o qual afirma que a auto-incompatibilidade gametofítica homomórfica (GSI) é um mecanismo amplamente distribuído entre as leguminosas. Ainda com relação às características da história vital da espécie influenciando a variação genética dentro das populações, Arroyo (1981) afirma que o gênero *Machaerium* é visitado na floração por um grande número de espécies de abelhas representando muitos gêneros diferentes.

Mantovani (1983) classificou a espécie como anemocórica, baseado na forma, estrutura e dimensão dos disseminulos que permitem a dispersão das sementes pelo vento.

2.2. A eletroforese de isoenzimas

A técnica de eletroforese de isoenzimas foi um marco importante nos estudos de genética de populações e evolução, porque forneceu um meio direto da avaliação da variação genética e mesmo havendo técnicas suplementares com poderes de detecção dos efeitos mutacionais no DNA, as isoenzimas ainda apresentam um potencial enorme para aplicação em genética de plantas (Torggler et al., 1995).

O método tem sido nos últimos vinte anos a ferramenta mais utilizada para a análise da estrutura genética de populações, tendo sido empregado neste período para o estudo de mais de 700 espécies de plantas (Hamrick & Godt, 1990; Sebbenn, 1997). Seu uso é amplo por sua relativa eficiência e custo, particularmente em estudos de variabilidade intraespecífica (Kephart, 1990). Segundo esta autora, as proteínas permanecem como importantes produtos pós-transcricional e de tradução do DNA de um organismo e como componentes enzimático e estrutural das células.

O emprego de locos alozímicos como marcadores genéticos, pressupõe codominância e neutralidade (Reis, 1996). A codominância permite diferenciar as formas enzimáticas dos homozigotos das formas dos heterozigotos. A neutralidade possibilita o emprego de modelos que não envolvem seleção, fator de difícil caracterização, especialmente em populações naturais (Reis, 1996). Não obstante

este pressuposto, em revisão de Torggler et al. (1995), nota-se uma grande controvérsia sobre o assunto entre os evolucionistas, tendo sido obtidas algumas evidências do valor adaptativo dos alelos dos locos alozímicos.

Por outro lado, a neutralidade dos locos enzimáticos admite um comportamento diferenciado entre os alelos dos locos sob efeito da seleção natural e os locos neutros (Muona, 1990), associando assim, segundo Reis (1996) um viés no pressuposto da representatividade do genoma.

Ainda assim, a utilização de técnicas bioquímicas, tal como a eletroforese, para medir a variação genética, apresenta inúmeras vantagens em relação às técnicas tradicionais (ensaios de campo), porém, a principal é a possibilidade de caracterizar as forças evolutivas sem a influência da seleção, permitindo uma maior compreensão do comportamento das populações naturais.

2.3. A variabilidade genética

Preservar o potencial evolutivo das espécies pela manutenção dos níveis naturais de diversidade genética é um dos objetivos dos conservacionistas (Yeeh et al., 1996).

Segundo Frankel (1983), o conhecimento dos níveis e da distribuição da variação genética dentro e entre populações, torna-se um pré-requisito para o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas e eficientes. Sebbenn (1997) destaca que o sucesso de um programa de conservação genética depende diretamente dos níveis de variabilidade genética das populações de interesse, sendo uma concordância entre os geneticistas.

A variação genética é uma condição fundamental para que haja evolução, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações em função da adaptação ao ambiente, convergindo para a variação entre populações e finalmente, para a variação entre espécies (Torggler et al., 1995).

A detecção e quantificação da variabilidade genética também são de interesse para o melhoramento de plantas, pois o objetivo é fixar variantes genéticas úteis dentro de cultivares, através de cruzamentos seletivos (Torggler et al., 1995).

Kageyama et al. (1989) também destacam a importância de associar-se a estrutura genética populacional das espécies aos trabalhos de recomposição,

objetivando a conservação dos recursos genéticos. Para estes autores, essa abordagem deve considerar tanto os aspectos pragmáticos das ações que levam à recomposição da vegetação, assim como os aspectos mais teóricos relacionados ao resgate de todo o “*pool*” gênico das populações das espécies.

Ainda, como medida da representatividade genética, Vencovsky (1987) adaptou o conceito de tamanho efetivo populacional para aplicação em atividades de coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas.

Kageyama & Gandara (1993) abordaram também o papel da variação genética na dinâmica das populações das espécies arbóreas, como forma de se fazer o manejo sustentado e a conservação genética na floresta tropical.

Portanto, a determinação da variabilidade genética tem aplicação tanto para o manejo, conservação e melhoramento dos recursos quanto para a recomposição de áreas degradadas.

2.3.1. Medindo a variação genética intrapopulacional

Existem diferentes formas de medir a variabilidade, sendo os descritores mais simples as frequências de alelos e genótipos (Lepsch-Cunha, 1996). No caso de isoenzimas, para as quais a reação de coloração *in vitro* fornece um padrão de variação fenotípica que, salvo as restrições do método, deve ser representativo da variação genotípica, as frequências genotípicas são as próprias frequências fenotípicas (Torggler et al., 1995). A codominância das isoenzimas permite a identificação de todos os genótipos.

Neste caso, a frequência alélica pode ser estimada pela contagem do número de genes na amostra ou a quantidade de cada alelo dividida pelo número total de genes na amostra (Nei, 1987; Torggler et al., 1995).

Outras estatísticas têm sido usadas para caracterizar a variação ao nível intrapopulacional. São elas a porcentagem de locos polimórficos, o número de alelos por loco, o número efetivo de alelos por loco, a heterozigosidade e a diversidade gênica (Torggler et al., 1995; Lepsch-Cunha, 1996; Sebbenn, 1997).

-Proporção de locos polimórficos (P)

A determinação do polimorfismo de um loco tem se baseado na adoção de

critérios quantitativos e arbitrários, que classificam as frequências alélicas de acordo com a sua maior ou menor ocorrência na população, ou seja, se o alelo é mais comum ou menos comum (Torggler et al., 1995). Segundo Lepsch-Cunha (1996) um loco é chamado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum é igual ou menor a 0,99 ou 0,95.

Sebbenn (1997) adota o limite superior de frequência (0,99) para classificar um loco polimórfico. Nota-se portanto, a arbitrariedade da definição. O fato porém, segundo Nei (1987), é que não existe razão alguma para que a distinção entre os locos monomórficos e polimórficos não seja feita com outros valores similares.

A quantidade de polimorfismo, expressa em termos numéricos pelo número de locos polimórficos em porcentagem (P) é dada pela média de locos polimórficos ao nível populacional (razão entre locos polimórficos e o total de locos da amostra) (Torggler et al., 1995).

A proporção de locos polimórficos é uma medida da variação gênica dependente do tamanho da amostra, não sendo uma estatística adequada em amostras pequenas e com um número pequeno de locos (Nei, 1987; Torggler et al., 1995; Berg & Hamrick, 1997).

Quando um grande número de locos e indivíduos são analisados o P fornece um importante aspecto da variação dentro de populações (Lepsch-Cunha, 1996).

-Número médio de alelos por loco (A)

Esta medida consiste da razão entre o número de alelos encontrados na população e o número total de locos, sendo também usada para caracterizar a variação intrapopulacional.

É uma medida que caracteriza um outro componente da diversidade chamado riqueza alélica (Brown & Weir, 1983), porém, estes autores afirmam ser uma estatística com algumas restrições, pois ela considera os alelos igualmente, independente de sua importância biológica, sendo ainda sensível ao tamanho da amostra.

Quanto a dependência do tamanho amostral, Nei (1987) afirma que isso ocorre porque há muitos alelos de baixa frequência em populações naturais. Berg & Hamrick (1997) consideram que o número médio de alelos por loco polimórfico (AP) é mais informativo que A, pois AP independe da proporção de locos

polimórficos, tendo em vista que os locos monomórficos têm apenas um alelo.

Alguns estudos incluem entre seus descritores de variabilidade o número efetivo de alelos por loco (Lepsch-Cunha, 1996; Yeeh et al., 1996), dado pela média do recíproco da homozigosidade esperada em cada loco, ou seja, $A_e = 1 / \sum p_i^2$, em que p_i é a frequência do alelo “i” em um dado loco (Nei, 1987). Esta estatística inclui a equitabilidade das frequências alélicas além da riqueza (Brown & Weir, 1983), porém, para Nei (1987) ela não se comporta bem.

-Heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (H)

A heterozigosidade esperada é uma das medidas mais difundida para descrever a variação genética em plantas. Provavelmente seja o índice de diversidade genética para dados alozímicos mais comumente usado, pois ele sumariza a variação genética fundamental de uma população ou espécie em uma única estatística (Berg & Hamrick, 1997).

Por não depender da definição arbitrária de polimorfismo, a heterozigosidade média ou diversidade gênica é uma medida mais apropriada de variação genética (Nei, 1987).

Em uma população de cruzamentos ao acaso, seja x_i a frequência populacional do i-ésimo alelo em um loco, a heterozigosidade para este loco pode ser definida como

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2, \text{ em que } m \text{ é o número de alelos}$$

e a heterozigosidade média (H) é a média dessa quantidade sobre todos os locos (Nei, 1987).

Este autor define H como a proporção média de heterozigotos por loco em uma população de cruzamentos aleatórios e é igual a proporção esperada de locos heterozigóticos em um indivíduo escolhido ao acaso, tendo portanto, um significado biológico muito claro.

Contudo, essa interpretação não é válida para casos em que as frequências genotípicas desviam-se das proporções de Hardy-Weinberg. Neste caso, Nei (1973, 1987) considera H a probabilidade de que dois genes escolhidos ao acaso de uma população sejam diferentes sendo equivalente a heterozigosidade, preferindo chamá-la de diversidade gênica.

O termo diversidade gênica pode assim ser aplicado a qualquer organismo, seja haplóide, diplóide ou poliplóide e para qualquer tipo de sistema reprodutivo (cruzamento aleatório, autofecundação ou reprodução assexual) (Nei, 1973, 1987). Além disso, este autor chamou de identidade gênica ou probabilidade de identidade (J) o resultado de $1-h$.

As propriedades amostrais dessa estatística foram descritas por Nei (1987), conforme abaixo.

Assumindo que X_{ij} seja a frequência populacional do genótipo A_iA_j em um loco e que n indivíduos são amostrados ao acaso, pode-se determinar a frequência A_iA_j da amostra, denotada por $\hat{X}_{ij}$, esta uma estimativa não viesada de X_{ij} , desde que a amostragem seja multinomial.

A frequência alélica estimada ($\hat{x}_i$) é dada por

$$\hat{x}_i = \hat{X}_{ii} + \sum_{j \neq i} \hat{X}_{ij} / 2$$

e portanto a diversidade gênica amostral é $\hat{h}_1 = 1 - \sum \hat{x}_i^2$.

Contudo, isto não é uma estimativa não viesada de h . Sob a pressuposição de amostragem multinomial, a esperança de $1 - \sum \hat{x}_i^2$ é dada por $(1 - \sum x_i^2)(1 - 1/2n)$, em que n é o número de indivíduos amostrados.

Uma estimativa sem viés de h é dada por $\hat{h} = 2n(1 - \sum \hat{x}_i^2) / 2n - 1$.

Observa-se por esta última equação que o viés em $\hat{h}_1$ é negligível quando $n \geq 50$.

Já a estimativa da diversidade gênica média (H) é obtida sob r locos do genoma, ou seja,

$$\hat{H} = \sum_{j=1}^r \hat{h}_j / r ,$$

em que $\hat{h}_j$ é o valor de $\hat{h}$ para o j -ésimo loco. O tamanho amostral n pode variar de loco para loco. Entre as principais vantagens da heterozigosidade média esperada estão a insensibilidade ao tamanho amostral e a fácil interpretação do significado genético e quanto a desvantagem, a dependência da frequência dos dois alelos mais comuns (Brown & Weir, 1983).

A tabela 2 mostra a variação genética medida pelos parâmetros P , A e H de algumas espécies arbóreas tropicais.

Tabela 2. Variação genética de espécies arbóreas tropicais, medida pelos parâmetros P, A e H. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999. NI = número de locos; Np= Número de populações.

Espécie	NI	Np	P	A	H	Referência
<i>Acacia albida</i>	17	22	90,00	4,30	0,454	Joly et al. (1992)
<i>Agathis borneensis</i>	17	5	23,00	1,24	0,084	Kitamura & Rahman (1992)
			29,00	1,41	0,124	
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	22	4	31,80		0,153	Eguiarte et al. (1992)
<i>Calliandra calothyrsus</i>	23	15	20,46	1,22	0,075	Chamberlain (1998)
<i>Camellia japonica</i>	17	16	68,75	2,77	0,278	Yeoh et al. (1996)
			68,06	2,51	0,254	
<i>Carapa procera</i>	15	1	67,00	1,70	0,17	Doligez & Joly (1997).
<i>Cedrela fissilis</i>	8	1	76,9	2,31	0,243	Gandara (1995)
<i>Chorisia speciosa</i>	9	1	77,78	2,22	0,284	Souza (1997)
<i>Couratari guianensis</i>	8	1	100,00	2,75	0,420	Lepsch-Cunha (1996)
<i>Couratari multiflora</i>	7	1	100,00	3,25	0,431	Lepsch-Cunha (1996)
<i>Genipa americana</i>	8	2	50,00	1,63	0,182	Sebbenn (1997)
<i>Hevea brasiliensis</i>	4	2	100,00	4,00	0,319	Paiva (1992)
			75,00	4,30	0,295	
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	8	2	25,00	1,30	0,076	Lacerda (1997)
			50,00	1,60	0,121	
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	3	2	66,70	2,70	0,356	Moraes (1992)
			66,70	3,00	0,243	
<i>Pithecellobium elegans</i>	6	8	35,00	1,24	0,130	Hall, Walker & Bawa (1996)
<i>Stemonoporus oblongifolius</i>	9	4	100,00	3,11	0,342	Murawski & Bawa (1994)
<i>Acalypha diversifolia</i>	29		67,80	2,14	0,273	Loveless & Hamrick (1987)
<i>Sorocea affinis</i>	36		72,20	2,04	0,239	"
<i>Quararibea asterolepis</i>	30		64,40	1,99	0,256	"
<i>Swartzia simplex</i> var. <i>ochracea</i>	36		75,90	2,34	0,272	"
<i>Psychotria horizontalis</i>	20		50,00	1,68	0,152	"
<i>Alseis blackiana</i>	26		89,70	2,64	0,374	"
<i>Hybanthus prunifolius</i>	42		69,80	1,87	0,247	"
<i>Rinorea sylvatica</i>	35		35,20	1,43	0,106	"

No trabalho conduzido por Loveless & Hamrick (1987), os valores médios de P, A e H encontrados para as espécies arbóreas tropicais foram 65,6, 2,02 e 0,240, respectivamente, com o número médio de locos estudados na faixa de 32.

Hamrick & Murawski (1991) compilaram alguns dados de seus estudos sobre a diversidade genética de espécies arbóreas tropicais, conduzidos na Ilha de Barro Colorado no Panamá. Os valores médios obtidos para as espécies raras (até quatro indivíduos por hectare) foram 41,8% de locos polimórficos e 0,142 de diversidade gênica (H) enquanto para as espécies comuns estes valores foram de 56,7% e 0,211, respectivamente.

Hamrick et al. (1979) relacionaram características da história vital sobre a variabilidade genética em populações de plantas e concluíram que os maiores valores de variação estão associados a espécies perenes de ciclo longo, preferencialmente de reprodução cruzada, polinizadas pelo vento e com alta fecundidade. Embora não tenha sido detectada uma associação clara entre o nível de variação e a dispersão de sementes, os autores sustentam que espécies com dispersão restrita teriam menor variação genética que aquelas com dispersão a grandes distâncias e extensivo fluxo gênico.

2.4. Estrutura Genética

A estrutura populacional de uma espécie, definida como o conjunto de suas características genéticas e demográficas, é o resultado da ação e das interações de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos (Martins, 1987).

Na revisão feita por este autor, é mencionado que a união dos princípios teóricos da genética com os de ecologia de populações, resultou no aparecimento da biologia de populações, o qual vem oferecendo fundamento teórico consistente para analisar e interpretar, sob o enfoque evolutivo, a dinâmica populacional.

Se do ponto de vista ecológico a caracterização da estrutura populacional procura determinar a densidade populacional, a natureza das relações entre os indivíduos e o ambiente e as interações entre os indivíduos e as populações locais; a abordagem genética e evolutiva, por outro lado, procura quantificar a variabilidade morfológica e quantitativa existente entre os indivíduos, seu comportamento reprodutivo, os padrões de fluxo gênico e a estratégias adaptativas aos ambientes

locais (Martins, 1987).

Brown (1978) define a estrutura genética populacional como a medida dos padrões de variação de uma espécie dada pela diversidade genética da população, a variação nos níveis de diversidade em diferentes populações e a extensão e variação em correlação ou distância genética entre populações.

Os estudos de variação genética em populações naturais envolvem duas questões básicas (Hamrick, 1983): a primeira é descrever os níveis de variação genética mantidos dentro das populações ou espécies; a segunda, de particular interesse para a conservação dos recursos genéticos, é o modo como a variação está partilhada dentro e entre as populações. A resposta a essas questões é de fundamental interesse para o manejo racional dos recursos de populações naturais.

Todo o fundamento dos estudos de estrutura genética parte do teorema de Hardy-Weinberg, o qual é a base da teoria genética da evolução. O teorema de Hardy-Weinberg assume, sob certas premissas, que a abundância relativa dos alelos não muda de uma geração para outra; a única mudança na composição genética da população é a redistribuição dos genótipos em frequências que serão mantidas em todas as gerações subsequentes (Futuyma, 1992).

As premissas subordinadas a este teorema, são, segundo Futuyma (1992):

- a) o tamanho da população é infinito ou efetivamente infinito;
- b) os indivíduos cruzam-se aleatoriamente;
- c) os alelos são igualmente competentes na síntese de cópias de si mesmos, isto implica ausência de seleção;
- d) não ocorre a introdução de novas cópias de qualquer alelo a partir de fonte externa, ou seja, não há migração nem mutação.

Afirma ainda este autor, que as discrepâncias entre uma população “ideal” de Hardy-Weinberg e as populações reais são os ingredientes da evolução.

Assim, tomando-se como referência o teorema de Hardy-Weinberg, as principais forças microevolutivas podem ser tomadas como desvios deste equilíbrio, ou seja, a formação de estrutura decorre de fatores como sistema reprodutivo, níveis de endogamia, seleção natural, fluxo gênico e deriva genética entre e dentro das populações (Reis, 1996).

Nos estudos de estrutura genética então, alguns modelos matemáticos variantes do teorema de Hardy-Weinberg são empregados, para além de quantificar a

estrutura, caracterizar seus eventos determinantes e assim permitir o entendimento do comportamento dos alelos e a dinâmica das populações naturais.

Isto possibilita traçar estratégias de manejo e conservação das populações naturais de espécies, sobretudo as arbóreas.

2.4.1. Caracterização da estrutura genética

Os métodos estatísticos geralmente utilizados para caracterizar a estrutura genética populacional, a partir de isoenzimas são: a análise de variância de frequências alélicas (Cockerham, 1969; Vencovsky, 1992; Weir, 1996); a diversidade genética de Nei (Nei, 1973) e as estatísticas F de Wright (Wright, 1965). Ainda que, com bases genéticas similares, as três abordagens são complementares no sentido biológico das estimativas obtidas (Reis, 1996).

Uma das estatísticas mais difundidas para a caracterização de estrutura genética populacional é a estatística F. Wright (1943, 1951) foi quem derivou as propriedades dessa estatística por meio de análises de correlações. Posteriormente, outras abordagens para o seu cálculo utilizando-se regras de probabilidades (Li & Horvitz, 1953; vários autores citados em Crow & Kimura, 1970) foram desenvolvidas e ainda Nei (1977, 1987) pontuou a possibilidade de se calcular o F a partir das heterozigosidades observadas e esperadas, independente das forças evolutivas envolvidas e do tamanho das populações.

O coeficiente de endogamia ou índice de fixação (F) mede a redução da heterozigose a partir do teorema de Hardy-Weinberg (Reis, 1996).

Sabe-se que a endogamia ocorre quando os cruzamentos são mais intimamente relacionados do que seria se eles ocorressem ao acaso em uma população (Crow & Kimura, 1970). Assim, em uma população na qual o coeficiente de endogamia médio é F, as frequências genotípicas, são as seguintes (Wright, 1943; Crow & Kimura, 1970; Nei, 1987):

Genótipo	Frequência
AA	$X = q^2 (1-F) + qF$
Aa	$Y = 2q(1-q)(1-F)$
aa	$Z = (1-q)^2 (1-F) + (1-q)F$, em que q é a frequência do alelo A.

Pode-se notar por essas expressões, que quando F é igual a zero, as frequências reduzem-se ao usual teorema de Hardy-Weinberg e quando F é igual a um, a população será completamente homozigótica. O F varia de zero em uma população de cruzamentos aleatórios a um quando da completa homozigosidade (Crow & Kimura, 1970).

Nei (1987) entretanto, diz que o F tanto pode ser positivo ou negativo, dependendo do caso. Disto decorre a vantagem de se abordar o F em termos de correlação em vez da interpretação probabilística, pois no primeiro caso os valores negativos têm um significado (Crow & Kimura, 1970).

De acordo com Nei (1987) entre os importantes fatores que causam um valor de F diferente de zero, destacam-se:

- a) Endogamia - a endogamia aumenta a frequência dos homozigotos, e se não houver qualquer outro fator, F é igual ao coeficiente de endogamia de Wright e neste caso será sempre positivo.
- b) Cruzamentos preferenciais (*Assortative mating*) - Referem-se a cruzamentos não aleatórios, nos quais os indivíduos cruzam-se seletivamente, tendo alguns caracteres fenotípicos similares. Este fator tem um efeito semelhante ao da endogamia, aumentando a proporção dos homozigotos, porém, seus efeitos concentram-se apenas nos locos envolvidos no caráter de associação.
- c) Seleção - Dependendo do tipo, a seleção pode aumentar ou diminuir o valor de F . Se os heterozigotos tem um menor valor adaptativo (*fitness*) do que os homozigotos, o F se torna positivo. Por outro lado, se os heterozigotos tem um *fitness* superior do que os homozigotos o F torna-se negativo. Porém, F negativo não necessariamente significa uma vantagem do heterozigoto.
- d) Subdivisão da população - É muitas vezes difícil saber a estrutura reprodutiva de uma população, e esta pode incluir várias unidades de cruzamento ou subpopulações. Neste caso, mesmo que cada subpopulação se encontre em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (demes panmíticas), as frequências genotípicas na população como um todo podem se desviar das proporções de HW (princípio de Wahlund).

Como visto, há diferentes situações em que o valor F se aplica e em que pode significar aspectos distintos, havendo então a necessidade de mais que um valor para caracterizar a população (Wright, 1951).

As extensões das estatísticas F são dadas por Wright (1943), em que este autor adota um modelo matemático no qual a população é subdividida em subgrupos, cada qual com uma estrutura própria de cruzamento aleatório, exceto para uma certa proporção de migrantes tomados ao acaso da população como um todo. O autor denominou este modelo como modelo de ilhas, pois as situações são consideradas aproximadas a um grupo de ilhas. Neste modelo, a endogamia medida por F pode ser devida tanto aos cruzamentos esporádicos de indivíduos aparentados sem tendência a quebra da população em subgrupos, como à divisão em subgrupos isolados parcialmente, dentro dos quais há cruzamentos aleatórios (Wright, 1943).

A frequência gênica (q) de um subgrupo tende a variar em torno de um certo ponto de equilíbrio ($\hat{q}$) em uma curva de distribuição determinada por Δq o qual mede a taxa de alteração das frequências gênicas por geração devido a mutações recorrentes, migração e seleção; em conjunto com os efeitos cumulativos de amostragem (desvios casuais δq , com variância por geração $\sigma_{\delta q}^2$) (Wright, 1943). Em uma população de cruzamentos aleatórios, estes efeitos são dados por

$$\sigma_{\delta q}^2 = q(1-q)/2N, \text{ em que } N = \text{tamanho da população.}$$

Seja N o tamanho efetivo do subgrupo, m a proporção efetiva da sua população que é reposta por migrantes em cada geração, q_t a frequência gênica na população total e assumindo que o valor de Δq é suficientemente pequeno de forma que termos tais como $(\Delta q)^2$ possam ser ignorados, um valor mais acurado de σ_q^2 é obtido diretamente, a partir dos desvios em torno de $\hat{q}$, sendo que em um balanço entre os efeitos de migração e amostragem, σ_q^2 é dado por (Wright, 1943):

$$\sigma_q^2 = q_t(1-q_t)/[2N - (2N-1)(1-m)^2]$$

Assumindo que haja K subgrupos cada um de tamanho N , a proporção de heterozigotos dentro dos grupos é $2q'(1-q')$ e a proporção de heterozigotos na população total é

$$Y_t = 2 \sum_1^K q'(1-q') / K = 2q_t - 2 \left(\sum_1^K q'^2 \right) / K$$

A variância das frequências gênicas dos subgrupos, será dada por

$$\sigma_q^2 = (\sum q_i^2) / K - q_i^2$$

Assim, a proporção de heterozigotos na geração seguinte será

$$Y_i = 2q_i(1 - q_i) - 2\sigma_q^2 \text{ e por consequência } \sigma_q^2 = q_i(1 - q_i)F.$$

Aqui F tem um significado adicional de representar a medida da variância da frequência de alelos neutros entre grupos, relativa ao valor limite $q(1-q)$ quando da completa fixação do alelo (Wright, 1951), ou em outras palavras no caso de populações subdivididas a heterozigosidade da população total será reduzida em duas vezes a variância devido a variação das frequências gênicas entre os subgrupos. Cockerham (1969) no desenvolvimento de seu modelo de análise de variância de frequências gênicas já afirmara que “a variância entre frequências gênicas para genes neutros de grupos de indivíduos depende da endogamia e do relacionamento dos indivíduos no grupo bem como do número de indivíduos”.

No caso de não haver endogamia dentro dos grupos a variância será

$$\sigma_q^2 = q(1-q)F_{IT} \text{ em que } F_{IT} \text{ é o coeficiente de endogamia em relação ao total ou endogamia devida ao efeito de subdivisão (Princípio de Wahlund) (Wright, 1943).}$$

Ocorrendo endogamia dentro dos grupos, a variância da frequência gênica entre os grupos é dada por (Wright, 1943)

$$\sigma_q^2 = q(1-q)(F_{IT} - F_{IS})/(1-F_{IS}) \text{ e a heterozigosidade dentro do grupo é}$$

$H=2q'(1-q')(1-F_{IS})$ em que F_{IS} é o coeficiente de endogamia ao nível de grupo e equivale a média dos índices de fixação entre os grupos.

Wright (1943, 1951, 1965) ainda dá um índice do total da diferenciação entre grupos, definido como F_{ST} , dado por:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_q^2}{\bar{q}(1-\bar{q})}, \text{ em que } \bar{q} \text{ é a frequência média de um dado alelo entre as subpopulações.}$$

Wright (1951) estabeleceu a relação $(1-F_{IT}) = (1-F_{IS})(1-F_{ST})$.

Por essa terminologia, F_{IS} é a correlação entre gametas que se unem para

produzir indivíduos em relação a subpopulação; F_{IT} a correlação entre a união de gametas em relação a população total e F_{ST} é a correlação entre gametas tomados ao acaso nas subpopulações em relação a população total e mede o nível de diferenciação genética das subpopulações (Wright, 1965; Crow & Kimura, 1970, Nei, 1987). O F_{ST} é necessariamente positivo, enquanto os demais podem assumir qualquer valor entre -1 e +1 (Crow & Kimura, 1970).

As estatísticas F também podem ser obtidas a partir das heterozigosidades observadas e esperadas, segundo Nei (1977, 1987). Segundo este autor, as estatísticas F obtidas por esse modelo podem ser aplicadas em qualquer situação, havendo ou não seleção e não importando quanto alelos segregam em um loco.

Assim, as estimativas dos F's por esse modelo são dadas por:

$$\hat{F}_{IS} = 1 - \hat{h}_o / \hat{h}_s$$

$$\hat{F}_{IT} = 1 - \hat{h}_o / \hat{h}_T$$

$$\hat{F}_{ST} = 1 - \hat{h}_s / \hat{h}_T$$

$$\hat{h}_o = 1 - \sum_{k=1}^s \sum_{i=1}^m \hat{X}_{kii} / s$$

$$\hat{h}_s = 1 - \sum_k \sum_i x_{ki}^2 / s$$

$$\hat{h}_T = 1 - \sum \bar{x}_i^2, \text{ em que}$$

$\hat{h}_o$ é a heterozigosidade observada média sobre todas as subpopulações;

$\hat{h}_s$ é a heterozigosidade esperada média sobre todas as subpopulações;

$\hat{h}_T$ é a heterozigosidade esperada total média da população

X_{kii} é a frequência dos homozigotos $A_i A_i$ na subpopulação k;

x é a frequência do alelo i na subpopulação k;

m é o número de locos;

s é o número de subpopulações.

Uma outra forma de analisar a estrutura genética é por meio dos coeficientes de coancestralidade (θ) de Cockerham (1969).

O coeficiente de coancestralidade (θ) dá a correlação entre a frequência de um alelo ao acaso de um indivíduo com a de um alelo ao acaso de um outro indivíduo (Cockerham, 1969). A abordagem da correlação se dá por meio de

covariâncias de pares de alelos.

Segundo Cockerham (1969) a essência de sua teoria é que a variância entre frequências gênicas para genes neutros de grupos de indivíduos depende da endogamia e do parentesco dos indivíduos no grupo bem como do número de indivíduos.

A obtenção dos valores de θ se dá por meio da decomposição das variâncias da análise de variância das frequências alélicas (Reis, 1996). Segundo Vencovsky (1992) a variância é uma propriedade importante das frequências gênicas e sua análise permite descrever eficientemente a estrutura de populações quando dispõe-se de dados de marcadores bioquímicos ou moleculares.

O modelo considerado por Cockerham (1969) é o aleatório, em que pressupõe-se que todas as entidades da estrutura hierárquica são obtidas por amostragem. A estrutura hierárquica é a composição dos diversos níveis amostrais utilizados em um estudo, no qual cada grupo ou classe são subdivididos em subgrupos escolhidos aleatoriamente (Sokal & Rohlf, 1981). Segundo estes autores, o delineamento de análise de variância para este modelo é chamado “*nested*” (aninhado) ou hierárquico (“*hierarchical analysis of variance*”) porque a classificação subordinada é aninhada dentro de níveis superiores de classificação. Nos estudos de genética de populações os níveis hierárquicos mais comuns são genes dentro de indivíduos, indivíduos dentro de grupos, grupos dentro de populações e assim sucessivamente até o nível superior de amostragem.

O modelo de Cockerham (1969) admite geneticamente que a diversidade entre as populações foi, fundamentalmente provocada por deriva genética ocorrida em gerações passadas (Vencovsky, 1992).

Sob o modelo aleatório, as populações amostradas são consideradas representativas da espécie e portanto, têm uma história evolutiva comum; mesmo que as populações foram distintas por algum tempo, a análise é construída na pressuposição de que houve uma população ancestral única (Weir, 1996).

Na ausência de forças perturbadoras, prossegue o autor, todas as populações são esperadas ter as mesmas frequências alélicas. O processo de amostragem genética ou deriva entre sucessivas gerações, resultará em diferenciação intraespecífica, que pode ser convenientemente quantificada, tanto pelas estatísticas F ou medidas análogas de Cockerham (Weir, 1996).

Segundo Cockerham (1969), a coancestralidade de um grupo é determinada pelo parentesco dos indivíduos no grupo, exceto para um N muito pequeno. Assim se os membros do grupo não são endogâmicos e não aparentados a variância é $\sigma^2 = p(1-p)/2N$, em que p é a frequência do alelo no grupo. Caso haja parentesco e endogamia, o maior efeito deles é dobrar a variância de forma que:

$$\sigma^2 = (1+F) p(1-p) / 2N.$$

Neste modelo de covariâncias, todas as simplificações que resultam de um modelo aditivo podem ser realizadas, podendo então a variância total ser subdividida em componentes correspondentes às várias subdivisões dos genes (Cockerham, 1969).

Assim, segundo o autor, considerando o modelo linear

$$x_{kij} = p + a_k + b_{ki} + w_{kij}$$

em que “a” são os efeitos dos grupos “k”, “b” os efeitos de indivíduos “i” dentro de grupos “k” e “w” os efeitos de alelos (j) dentro de indivíduos (i) dentro de grupos (k), sendo os efeitos não relacionados e aleatórios com variância σ_a^2 , σ_b^2 e σ_w^2 , as esperanças dos quadrados médios sobre várias classes de pares de genes são:

$$Ex_{kij}x_{k'i'j'} =$$

$p^2 + \sigma^2$	se $k=k'$, $i=i'$, $j=j'$
$p^2 + Cov_{ab}$	se $k=k'$, $i=i'$, $j \neq j'$
$p^2 + Cov_a$	se $k=k'$, $i \neq i'$
$p^2 + Cov_g$	se $k \neq k'$.

Portanto, para grupos não correlacionados $Cov_g = 0$ e em termos paramétricos de correlações

$$\sigma^2 = p(1-p),$$

$$Cov_{ab} = \rho_{ab} p(1-p),$$

$$Cov_a = \rho_a p(1-p)$$

ρ = coeficiente de relacionamento de Wright.

As correlações ρ_a e ρ_{ab} relacionam-se aos componentes de variância, de modo que

$$(1 - \rho_{ab}) p(1-p) = \sigma_w^2,$$

$$(\rho_{ab} - \rho_a) p(1-p) = \sigma_b^2,$$

$$\rho_a p(1-p) = \sigma_a^2 \text{ e portanto,}$$

$$\sigma^2 = \sigma_w^2 + \sigma_b^2 + \sigma_a^2.$$

Segundo Cockerham (1969), as correlações intraclasse, as covariâncias e os componentes de variância são formas diferentes da mesma parametrização, podendo acomodar todos os fatores que levam à variação entre frequências gênicas, porém, se a variação decorre totalmente de deriva e do sistema de cruzamento, as consequências podem ser sumarizadas em termos de F e θ .

Desta forma, a correlação entre as frequências gênicas de diferentes indivíduos no mesmo grupo é (Cockerham, 1969):

$$\rho_a = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_w^2 + \sigma_b^2 + \sigma_a^2} = \theta,$$

a correlação de genes dentro de indivíduos de diferentes grupos é,

$$\rho_{ab} = \frac{\sigma_b^2 + \sigma_a^2}{\sigma_w^2 + \sigma_b^2 + \sigma_a^2} = F \text{ e}$$

de genes dentro de indivíduos dentro de grupos é

$$\rho_b = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_w^2 + \sigma_b^2} = \frac{F - \theta}{1 - \theta} = f.$$

O parâmetro θ é uma medida do grau de associação ou correlação das frequências gênicas dentro das populações, sendo também uma quantificação da distância genética entre as populações; o parâmetro F é o coeficiente de endocruzamento de Wright abrangendo a espécie como um todo e f é o coeficiente de endocruzamento dentro das populações (Vencovsky, 1992).

Desta forma F de Cockerham equivale ao F_{IT} de Wright, o θ ao F_{ST} e o f é igual ao F_{IS} . Essa identificação já havia sido notada por Cockerham (1969).

Este modelo foi ampliado por Cockerham & Weir (1987), os quais incorporaram os efeitos de mutação e migração. Vencovsky (1992) por sua vez, estendeu o modelo para abrigar um nível hierárquico intermediário de indivíduos dentro de famílias (progênes) dentro de populações, permitindo a estimativa da coancestralidade entre indivíduos dentro de famílias.

Por considerar o processo amostral nas estimativas dos parâmetros, a análise de variância apresenta uma precisão maior (Reis, 1996; Sebbenn, 1997).

Entre os trabalhos aplicados em espécies arbóreas, os quais utilizaram a

análise de variância como método pode-se citar Moraes (1992), Paiva et al. (1994), Reis (1996) e Sebbenn (1997).

Nei (1973, 1978, 1987) desenvolveu as estatísticas para a análise da estrutura genética em populações subdivididas, baseando-se nas identidades e diversidades gênicas. A primeira é definida como J e é calculada por

$$J = \sum_k x_k^2, \text{ em que } x_k \text{ é a frequência do k-ésimo alelo em uma população.}$$

O J é assim definido como a probabilidade de identidade de dois genes tomados ao acaso em um população. Por outro lado, a probabilidade de não identidade, a qual Nei (1973) chamou de H, é igual a

$$H = 1 - J.$$

O valor de H é uma medida de variação gênica de uma população e é chamado diversidade gênica ou heterozigiosidade de modo mais geral (Nei, 1973).

Para a análise da estrutura genética em populações subdivididas, Nei (1973, 1978, 1987) considerou como modelo uma população que é subdividida em s subpopulações. Assim, segundo esse modelo, seja x_{ik} a frequência do k-ésimo alelo na i-ésima subpopulação, a identidade gênica nesta subpopulação é dada por

$$J_i = \sum_k x_{ik}^2$$

enquanto a identidade gênica na população total é $J_T = \sum_k x_{.k}^2$, em que $x_{.k} = \sum_i w_i x_{ki}$ no qual w_i é o fator de ponderação para a i-ésima subpopulação, conseqüentemente $\sum w_i = 1$.

Considerando entretanto, $w_i = 1/s$, J_T torna-se

$$J_T = \left(\sum_i J_i + \sum_{i \neq j} J_{ij} \right) / s^2, \text{ em que } J_{ij} = \sum_k x_{ik} x_{jk},$$

no qual x_{ik} e x_{jk} são a frequência do k-ésimo alelo nas subpopulações i e j, respectivamente.

Definindo a diversidade gênica entre as subpopulações i e j como

$$\begin{aligned} D_{ij} &= H_{ij} - (H_i + H_j)/2 \\ &= (J_i + J_j)/2 - J_{ij}, \text{ de forma que } H_i = 1 - J_i \\ &\text{ e } H_{ij} = 1 - J_{ij}. \end{aligned}$$

Segundo Nei (1987), D_{ij} equivale a distância genética mínima entre duas populações. Considerando as deduções de D_{ij} , o valor de J_T é agora dado por

$$J_T = \left\{ \sum_i J_i + \sum_{i \neq j} (J_i + J_j) / 2 - \sum_{i \neq j} D_{ij} \right\} / s^2,$$

que por simplificação fica $J_T = \left(\sum_i J_i \right) / s - \left(\sum_i \sum_j D_{ij} \right) / s^2$

$$= J_S - D_{ST}.$$

J_S é a identidade gênica média dentro das subpopulações e D_{ST} é a diversidade gênica média entre as subpopulações, incluindo as comparações das subpopulações com elas próprias.

Como $H_T = 1 - J_T$ e $H_S = 1 - J_S$, obtém-se a relação,

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

que permite a análise da diversidade gênica populacional, por meio de sua partição em diversidade dentro e entre subpopulações (Nei, 1973, 1978, 1987). Em outras palavras, a diversidade total é composta pela variação dentro das populações mais o componente da diversidade entre as populações, e o que estas estatísticas permitem é o desdobramento destes componentes.

Nei (1973), dá ainda um parâmetro de diferenciação gênica relativo a população total (G_{ST}) que é obtido por:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T.$$

Nei (1973) demonstra que se houver apenas dois alelos em um loco, $H_T = 2\bar{x}(1 - \bar{x})$ e $D_{ST} = 2\sigma_x^2$, em que $\bar{x}$ e σ_x^2 são a média e a variância da frequência de um alelo entre as subpopulações, respectivamente, e portanto,

$$G_{ST} = \sigma_x^2 / \bar{x}(1 - \bar{x})$$

Neste contexto o F_{ST} de Wright e o G_{ST} de Nei são medidas equivalentes.

Os trabalhos conduzidos em espécies arbóreas tropicais visando determinar a estrutura genética destas espécies, não raro concentram-se em regiões da América Central e do Sudeste Asiático, sendo ainda incipientes a quantidade de dados sobre a América do Sul, especialmente sobre as florestas brasileiras.

A maioria dos estudos utiliza-se das estatísticas F (p.ex. Eguiarte et al., 1992; Yeeh et al, 1996; Chamberlain, 1998) na caracterização da estrutura genética populacional de espécies arbóreas tropicais. Há contudo, autores que fazem tal abordagem pela partição da diversidade gênica de Nei (p.ex. Kitamura & Rahman, 1992).

Uma tendência geral apontada por estes estudos é um excesso de heterozigotos na fase adulta, indicando uma forte seleção a favor desses genótipos. Doligez & Joly (1997), ao encontrarem este padrão de estrutura em *Carapa procera*, uma espécie monóica de baixa densidade, concluíram que o único modelo teórico que o explica é a sobredominância com íntimas ligações entre o marcador e o loco selecionado e seleção de intensidade suficiente para superar o excesso de homozigotos resultante da endogamia no estágio zigótico.

Parece haver ainda uma concentração da variabilidade distribuída quase que totalmente dentro das populações, fato evidenciado pelos baixos valores de F_{ST} e G_{ST} (ver tabelas 3 e 4). Por sinal, Vencovsky² afirma que raramente estas estatísticas de diferenciação populacional superam a 15%.

Realmente, a maior parte dos dados aponta para isto (tabelas 3 e 4). Há, porém, um escape apontado em Chamberlain (1998) em *Calliandra calothyrsus*, em que um valor superior a 80% foi apurado no F_{ST} . Porém, como reconhecido e discutido por esta autora, a definição de quatro grupos distintos desse taxa, sugere a diferenciação morfológica em várias espécies, advindo portanto, um alto valor para o F_{ST} .

Alguns resultados destes trabalhos estão demonstrados nas tabelas 3 e 4.

Loveless & Hamrick (1984) revisaram a influência de variáveis ecológicas sobre a estrutura genética das populações naturais de plantas. Entre os fatores que promovem a divergência entre as populações estão a autogamia ou a alogamia com um certo grau de endogamia; a morfologia floral a qual favorece ou dificulta certos tipos de cruzamento; o limitado fluxo gênico e dispersão de sementes; o estágio sucessional inicial e o reduzido tamanho populacional.

Ao contrário, Loveless & Hamrick (1984) indicaram que espécies com reprodução majoritariamente alógama, com amplo fluxo de pólen e sementes, pertencentes ao estágio final da sucessão, com ciclo de vida longo, mantém um maior tamanho efetivo e portanto tendem a serem mais homogêneas.

Em um estudo sobre oito espécies arbóreas, Loveless & Hamrick (1987), apuraram valores médios de 0,333, 0,352 e 0,050 para os índices H_S , H_T e G_{ST} , respectivamente.

---

² VENCOVSKY, R. (ESALQ/USP - Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, Piracicaba) - Comunicação Pessoal.

Tabela 3. Estrutura genética de espécies arbóreas tropicais segundo a abordagem pela estatística F. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999 . Np = Número de populações.

Espécie	Np	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}	Ref.
<i>Acacia albida</i>	22	0,207	0,304	0,123	Joly et al. (1992)
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	4	-0,4169 ^A -0,1885 ^S	-0,3585 ^A -0,1781 ^S	0,0396 ^A 0,0091 ^S	Eguiarte et al. (1992)
<i>Calliandra calothyrsus</i>	15	0,238	0,850	0,802	Chamberlain (1998)
<i>Chorisia speciosa</i>	4	0,115	0,278	0,183	Souza (1997)
<i>Euterpe edulis</i>	8	-0,067 ^A 0,042 ^S	-0,033 ^A 0,068 ^S	0,031 ^A 0,026 ^S	Reis (1996)
<i>Hevea brasiliensis</i> ¹	2	0,216	0,218	0,0025	Paiva (1992)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	2	-0,309 ^A 0,064 ^S	-0,289 ^A 0,077 ^S	0,015 ^A 0,014 ^S	Lacerda (1997)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	2	0,449	0,517	0,035	Moraes (1992)
<i>Psychotria officinalis</i>	5	0,055	0,144	0,095	Loiselle et al (1995)
<i>Genipa americana</i> ¹	2	-0,064 ^A 0,300 ^S	-0,058 ^A 0,283 ^S	0,006 ^A -0,024 ^S	Sebbenn (1997)

1-Valores estimados pelo método da Análise de Variância; A = Adultos;

S = Sementes.

Tabela 4. Partição da diversidade gênica de Nei, estimados para as espécies arbóreas tropicais. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999. Np = Número de populações

Espécie	Np	H _S	H _T	G _{ST}	Referência
<i>Agathis borneensis</i>	5	0,106	0,122	0,140	Kitamura & Rahman (1992)
<i>Euterpe edulis</i>	8	0,446 ^A 0,425 ^S	0,452 ^A 0,436 ^S	0,013 ^A 0,026	Reis (1996)
<i>Hevea brasiliensis</i>	2	0,3351	0,3356	0,0003	Paiva (1992)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	2	0,4357	0,4519	0,0358	Moraes (1992)
<i>Pithecellobium elegans</i>	8	0,281	0,312	0,101	Hall et al (1996)
<i>Stemonoporus oblongifolius</i>	4	0,298	0,342	0,163	Murawski & Bawa (1994)

A = Adultos; S = Sementes

2.5 Fluxo gênico

Fluxo gênico é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de genes de uma população para outra e que determinam a extensão para a qual as mudanças genéticas em populações locais são independentes (Slatkin, 1985). Segundo este autor, a variedade de métodos atualmente disponíveis para estimar os níveis de fluxo gênico em populações naturais demonstram que os níveis variam amplamente entre as espécies.

Há diversos modelos de fluxo gênico que correspondem a diferenças na estrutura da população, dentre os quais se incluem (Futuyma, 1992):

1. O modelo “continente-ilha”, no qual efetivamente existe um movimento unidirecional de uma população grande, “continental”, para uma menor isolada.
2. O modelo de “ilha”, no qual a migração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações.
3. O modelo de “alpondras” (“*stepping-stone*”), no qual cada população recebe migrantes somente de populações vizinhas.
4. O modelo de “isolamento pela distância”, no qual o fluxo gênico ocorre localmente entre os vizinhos, em uma população de distribuição contínua.

A maioria dos modelos considera que o fluxo gênico ocorre em uma taxa aproximadamente constante em cada geração, porém, em qualquer modelo de estrutura populacional, o fluxo gênico tem o efeito de homogeneizar a composição genética, ou seja, se o único fator operante for o fluxo gênico, todas as populações irão convergir para a mesma frequência alélica (geralmente uma média das frequências gênicas iniciais) (Futuyma, 1992).

Slatkin (1985) faz uma revisão dos métodos diretos e indiretos utilizados nas estimativas do fluxo gênico, discutindo os problemas e as pressuposições de cada um.

Segundo revisto por Reis (1996), enquanto as medidas diretas baseiam-se na distância de transporte de grãos de pólen e sementes, as indiretas fundamentam-se na relação entre a taxa de migração (m) e a divergência entre populações, indicando uma relação inversa entre a divergência e a migração, considerando um modelo de ilhas. Slatkin (1985) pondera que o termo migração é algumas vezes usado como sinônimo de fluxo gênico, o qual está correto quando a migração entre populações

estabelecidas é o mecanismo para o fluxo de genes.

Considerando então a relação entre migração e divergência em um modelo de ilhas, Wright (1931) mostrou que a variância da distribuição da frequência gênica entre grupos é

$$\sigma_q^2 = q_m(1 - q_m) / (4Nm + 1), \text{ em que}$$

q_m = frequência alélica média entre os grupos

N = tamanho efetivo populacional

m = proporção de migração entre os grupos

Desta equação temos que $\sigma_q^2 / q_m(1 - q_m) = (4Nm + 1)$ e portanto, como o F_{ST} (medida de divergência entre populações) é dado por $F_{ST} = \sigma_q^2 / \bar{q}(1 - \bar{q})$, estabelece-se a relação notada por Wright (1951), segundo a qual

$$F_{ST} = \frac{1}{4Nm + 1}$$

Assim, o valor de F_{ST} pode ser usado para estimar Nm e consequentemente o fluxo gênico, com o adendo de que o F_{ST} obtido segundo o modelo de ilhas de Wright, não requer nenhuma pressuposição sobre as causas das diferenças entre as subpopulações ou grupos (Slatkin, 1985).

A utilização de estimativas de divergência genética para determinar o total de fluxo gênico é um método tão eficiente quanto os demais, mesmo quando o modelo de estrutura populacional é contínuo ou quando existem efeitos de seleção (Slatkin & Barton, 1989).

Alguns modelos variantes ao de Wright na estimativa de Nm foram sendo apresentados, ou considerando as fontes de variação na composição estatística do F_{ST} ou incorporando fatores como mutação.

No primeiro caso, devido às propriedades estatísticas do F_{ST} , segundo pontua Slatkin (1985), o problema é combinar as informações de diferentes alelos para produzir uma estimativa com melhores propriedades estatísticas. Em sua revisão, este autor conclui que o modelo proposto por Wright, é válido desde que o número de grupos ou subpopulações seja grande e os efeitos de mutação sejam pequenos. Além disso, o F_{ST} pode ser combinado sob diferentes locos sem ter que assumir taxas iguais de mutação entre os locos.

Neste contexto, Crow & Aoki (1984) dão uma equação para a estimativa de

Nm com base no G_{ST} , a qual é:

$$G_{ST} \cong \frac{1}{4Nm\alpha + 1}$$

$$\text{em que } \alpha = \left[\frac{n}{n-1} \right]^2$$

n = número de populações.

Uma vez mais, esta equação reduz-se a usual relação de Wright quando n for grande (Crow & Aoki, 1984).

Cockerham & Weir (1987) realizaram derivações de estimativas de fluxo gênico por meio de medidas de correlações e de identidade por descendência a partir de uma estrutura hierárquica de análise das frequências gênicas de genes dentro de indivíduos, indivíduos dentro de subpopulações e estas dentro de populações. Suas medidas de certa forma concordam com a de Crow & Aoki (1984), exceto quanto ao número de subpopulações (n), que afeta diretamente a estimativa do G_{ST} , não sendo relevante no parâmetro de divergência estimado por Cockerham & Weir (1987).

Posteriormente, Cockerham & Weir (1993) realizaram simulações a partir de trabalhos relacionados ao assunto, porém, usando diferentes estimadores da divergência entre populações, concluindo que os métodos para estimar o fluxo gênico baseado nas estatísticas F tendem a ter grandes variâncias, porém, em certas condições podem prover estimativas de baixo viés.

A abordagem do fluxo gênico a partir da correlação entre divergência e migração permite portanto, quantificar o movimento de gametas ou indivíduos por meio de parâmetros, que independem do tamanho da população.

No caso do modelo de ilhas este parâmetro pode ser Nm que mede o número de gametas ou indivíduos que movem-se, ou o Nb que representa o tamanho de vizinhança nos modelos contínuos (isolamento pela distância) (Slatkin & Barton, 1989), sendo que a relação entre Nm e Nb é

$$Nb = 2\pi Nm$$

Segundo Sebbenn (1997), o tamanho de vizinhança corresponde ao número médio de indivíduos em um área onde ocorre panmixia. Com este parâmetro pode-se estimar a área de vizinhança, segundo a equação (Sebbenn, 1997):

$$A = Nb/D \text{ em que } D = \text{densidade de indivíduos.}$$

Wright (1931) baseando-se em uma curva de distribuição de frequências

gênicas entre grupos de uma população, demonstrou que quando m é menor que $1/2N$ há a tendência para a fixação por deriva de um ou outro alelomorfo. Porém, quando a medida m é igual a $1/N$ e portanto, Nm é igual a 1 por geração, não haverá diferenciação genética significativa entre populações, ou em outras palavras conforme Reis (1996), os efeitos da migração são suficientes para contrapor-se aos efeitos da deriva.

A despeito deste fato, Allendorf (1983) pontua que uma troca média de um migrante por geração manterá os mesmos alelos em todos os grupos ou subpopulações, porém, totais muito maiores de troca são necessários para manter frequências alélicas similares entre todas as subpopulações.

Não é comum os trabalhos com espécies arbóreas tropicais apresentarem os valores de Nm entre seus resultados. Exceção a isto são os trabalhos de Reis (1996) e Sebbenn (1997).

Reis (1996) analisando populações naturais de palmitreiro (*Euterpe edulis*) encontrou valores de Nm e Nb iguais a 10,7 e 67,0, respectivamente. A área de vizinhança calculada foi 7.586 m². No estudo de populações naturais de jenipapo (*Genipa americana*), Sebbenn (1997) encontrou um valor de Nm igual a 41,42 e de Nb igual a 260,23. Quanto a área de vizinhança, encontrou-se um valor de 4.501,98 m².

Os resultados do tamanho e área de vizinhança demonstram as unidades panmíticas, indicando que um número abaixo aos calculados implicaria em aumento da divergência entre as vizinhanças em decorrência do aumento interno dos níveis de endogamia.

2.6. Autocorrelação espacial

A autocorrelação espacial pode ser definida como a propriedade de variáveis assumirem valores, em pares de localidades separadas por uma certa distância, mais similares (autocorrelação positiva) ou menos similares (autocorrelação negativa) do que seria esperado pela associação aleatória dos pares observados (Legendre, 1993).

A estrutura da distribuição espacial dos genótipos em populações é parte integrante dos processos genéticos populacionais (Epperson & Allard, 1989).

Modelos teóricos clássicos indicam que a dispersão limitada e o cruzamento

por proximidade resultam em isolamento genético pela distância, mesmo em populações contínuas e grandes, sendo os resultados analíticos expressos em termos de coeficientes de endogamia ou consangüinidade médios ou esperados entre os indivíduos (Epperson, 1995).

Segundo a revisão de Shapcott (1995), a distribuição espacial da variabilidade genética dentro de populações naturais de plantas, pode influenciar processos evolutivos e ecológicos, formando uma parte integral do conceito de vizinhança bem como das teorias de especiação alopátrica e parapátrica. Desta forma, a estrutura espacial da variação genética dentro das populações tem conseqüências genéticas e ecológicas, pelo fato de resultar em agregados de genótipos particulares (Shapcott, 1995).

Isto tem importância quando populações naturais são delimitadas para a conservação ou amostradas para programas de melhoramento, pois assim maximiza-se a diversidade (Epperson, 1989). De outra forma, prossegue o autor, se a estrutura espacial é ignorada, isto pode levar a interpretações erradas do significado do sistema de cruzamento ou da seleção de genótipos particulares.

Os estudos sobre os padrões espaciais da variabilidade genética podem conduzir a novas reflexões sobre as causas que determinam a partilha da variação entre e dentro das populações (Leonardi & Menozzi, 1996). Segundo estes autores, embora possa ser irreal esperar que a autocorrelação espacial seja capaz de avaliar diferenças sutis entre os processos evolutivos, a técnica parece totalmente apropriada para descrever as principais forças evolutivas que afetam uma população.

Assim, se a estruturação espacial está afetando muitos locos, é razoável interpretar como evidência de migração ou processos relacionados ao fluxo gênico, ao passo que, correlogramas da estrutura espacial significativos para poucas características genéticas, podem ser seguramente interpretados como o resultado de deriva ou seleção (Sokal & Menozzi, 1982).

Ainda, a existência de estrutura genética espacial positiva, isto é, de indivíduos geneticamente correlacionados (aparentados), localizados próximos dentro das populações, pode ser indicativo da ocorrência de cruzamentos endogâmicos (Sebbenn, 1997).

Conforme revisto por Heywood (1991), a análise de autocorrelação espacial é um conjunto de procedimentos estatísticos delineados para detectar e quantificar a

dependência em uma variável baseado em valores amostrados de localidades múltiplas mapeadas em um espaço geográfico.

Segundo Sokal & Oden (1978), entre as variáveis às quais a análise de autocorrelação pode ser útil estão a variação geográfica de caracteres morfológicos, as frequências gênicas, os padrões de distribuição dos genótipos ou ainda a abundância de espécies. Estes autores fazem uma ampla revisão sobre as aplicações do método e os procedimentos estatísticos.

Uma das críticas que se faz ao método é que não considera-se as fontes de variações estocásticas no processo amostral das frequências gênicas (Slatkin & Arter, 1991). No entanto, Heywood (1991) afirma que este não é um problema apenas deste método, sendo comum a todas as estatísticas de estrutura espacial, como por exemplo o F_{ST} .

Entretanto, para uma dada intensidade amostral, estatísticas de autocorrelação baseadas em genótipos individuais obtidos com um esquema amostral otimizado, sofrem menos os efeitos da variação estocástica que as estatísticas F_{ST} baseadas em amostras cujo objetivo é caracterizar as subdivisões populacionais (Heywood, 1991).

Segundo Sokal & Oden (1978), o coeficiente de autocorrelação para dados de intervalo, tais como as frequências gênicas, é a estatística denominada I de Moran, a qual é análoga a um coeficiente de correlação em que o numerador é uma estimativa da covariância e o denominador uma estimativa da variância das observações.

O índice I de Moran varia de -1 a +1, tendo esperança matemática próxima a zero para tamanhos amostrais grandes na ausência de autocorrelação (Sokal & Oden, 1978). Sob a hipótese nula de independência espacial, a distribuição de I é assintoticamente normal, provendo assim um simples teste desta hipótese quando o número de localidades amostrais é suficientemente grande e a média e a variância da estatística são conhecidas (Heywood, 1991). Segundo revisto por este autor, é prática comum usar a aproximação normal de grandes amostras para I, conjugada com a média e a variância de I sob aleatorização, para convertê-lo a um desvio padrão normal que é então comparado a uma distribuição normal padrão.

Para obter o coeficiente de autocorrelação espacial de uma variável deve-se correlacionar os valores daquela variável a pares de pontos em um plano, contudo, nem todos os pares de pontos serão relacionados, mas apenas aqueles considerados

vizinhos (Sokal & Oden, 1978). Os pares são denominados adjacentes ou conectados.

Desde que os gráficos baseados em diferentes critérios implicam em diferentes hipóteses, os resultados das análises de autocorrelação do mesmo conjunto de dados necessariamente diferirão conforme o critério de conexão empregado (Sokal & Oden, 1978).

Entre os métodos mais frequentemente utilizados para conectar pares de localidades amostrais vizinhas, estão o algoritmo do vizinho mais próximo e a conexão de Gabriel (Sokal & Oden, 1978; Dewey & Heywood, 1988; Heywood, 1991; Gandara, 1995).

O método do vizinho mais próximo liga cada indivíduo apenas com o mais próximo, atribuindo pesos binários, geralmente $w=1$ para pares conectados e $w=0$ para todos os outros pares de localidades possíveis que não contribuem para o cálculo (Dewey & Heywood, 1988; Heywood, 1991).

Entre as vantagens do vizinho mais próximo, segundo Heywood (1991) está a maximização do poder de detecção de estrutura espacial pela análise de autocorrelação. Além disso, sob a hipótese de isolamento pela distância, o vizinho mais próximo deve ainda prover uma maior autocorrelação devido ao parentesco diminuir monotonicamente com a distância (Heywood, 1991).

Por outro lado, o método do vizinho mais próximo resulta em muitos grupos de indivíduos desconectados (Dewey & Heywood, 1988).

Na conexão de Gabriel, dois indivíduos A e B são considerados conectados se nenhum outro indivíduo ocorrer sobre ou dentro de um círculo cujo o diâmetro é o segmento de reta AB (Sokal & Oden, 1978).

Este algoritmo tem a vantagem de gerar mais pares amostrais que o vizinho mais próximo, reduzindo portanto o erro padrão das estatísticas de autocorrelação estimadas (Heywood, 1991).

Pode-se ainda computar a autocorrelação para pares de localidades em um número arbitrário de pontos ou unidades de distância geográfica, demonstrando como a autocorrelação muda em função da distância entre os pontos (Sokal & Oden, 1978). Segundo estes autores, um gráfico demonstrando esta relação é denominado correlograma.

Intuitivamente, suspeita-se da existência de estruturação dentro das

populações naturais de plantas (Perry & Knowles, 1991; Sebbenn, 1997), porém a maior parte dos estudos, sobretudo os que envolvem espécies arbóreas, tem rejeitado a hipótese de estruturação.

A maior quantidade de dados sobre os estudos deste gênero vem de espécies arbóreas das florestas temperadas, havendo poucos estudos sobre a estrutura espacial da floresta tropical.

Entre as espécies arbóreas da floresta temperada em que não verificou-se a existência de estruturação estão *Pinus contorta* ssp. *latifolia* (Epperson & Allard, 1989) e *Fagus sylvatica* (Leonardi & Menozzi, 1996).

Contudo, Perry & Knowles (1991) encontraram uma pequena estruturação na faixa de 20 a 30 metros de distância para a espécie arbórea temperada *Acer saccharum* e atribuíram o fato ao fluxo gênico restrito, a seleção e ao estabelecimento de mosaicos de côrtes distintas geneticamente.

Nesta mesma linha, Shapcott (1995) no estudo de dezessete populações de *Atherosperma moschatum*, árvore da floresta temperada pluvial australiana, encontrou uma autocorrelação positiva significativa em todos os locos e locais estudados, na faixa de até 10 metros de distância. A reprodução vegetativa e a dispersão localizada são as possíveis explicações para o resultado.

Entre as espécies arbóreas tropicais têm-se os estudos de Dewey & Heywood (1988) com *Psychotria nervosa*, Gandara (1995) com *Cedrela fissilis*, Doligez & Joly (1997) com *Carapa procera*, Sebbenn (1997) em *Genipa americana* e Souza (1997) em *Chorisia speciosa*, os quais não constatarem a existência de autocorrelação espacial, concluindo pela aleatoriedade da distribuição espacial dos genótipos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Caracterização dos locais de estudo.

O estudo foi realizado na Fazenda Campininha, no município de Mogi Guaçu, com área total de 4.501,16 ha, propriedade do Governo do Estado de São Paulo, por meio de sua Secretaria do Meio Ambiente. Situa-se na região fisiográfica denominada Depressão Periférica Paulista, entre os paralelos 22°10'43''S e 22°18'19''S e entre os meridianos 47°8'5''W.G. e 47° 11'34''W.G., com altitude média de 680 m (Batista, 1988; Pinto et al., 1997; Silva & Nakandakari³) (Figura 1). Segundo Pinto et al. (1997) a Fazenda é dividida em três unidades: a Reserva Biológica (470,04 ha) administrada pelo Instituto de Botânica/CINP⁴/SMA⁵, a Estação Ecológica (980,71 ha) e a Estação Experimental (3.050,41 ha), estas últimas sob a administração do Instituto Florestal/CINP/SMA.

Segundo Struffaldi-De Vuono et al. (1982), a Reserva Biológica de Mogi Guaçu é dividida em duas glebas denominadas “A” e “B”, com área de 343,42 ha e 126,62 ha, respectivamente. Visando uma classificação destas glebas para atender à preservação e à pesquisa, estes autores realizaram um zoneamento da Reserva Biológica.

A gleba “B”, a qual possui uma vegetação que varia do cerradão para mata, foi assim classificada como setor intocável, não comportando qualquer tipo de interferência. A gleba “A”, foi dividida em cinco áreas e classificada em três categorias de manejo, sendo duas de Setor de Pesquisa não Perturbatória (SPNP-1 e SPNP-2), duas de Setor de Pesquisa Perturbatória (SPP-1 e SPP-2) e uma como Setor

---

³ SILVA, D.M.; NAKANDAKARI, C. (Instituto Florestal, São Paulo, SP). Meio físico das unidades de Mogi Guaçu, SP. (Em elaboração)

⁴ CINP - Coordenaria de Informações Técnicas, Documentação e Pesquisa Ambiental

⁵ SMA - Secretaria de Estado do Meio Ambiente

Figura 1. Localização das populações. ❶ População Modelo Natural (MN); ❷ População Modelo Antrópico (MA) (Adaptado em mapa de Silva & Nakandakari, em prep.).

de Ensino (SE).

A Estação Ecológica, segundo Pinto et al. (1997) é uma área natural que inclui matas ciliares que margeiam o Rio Mogi Guaçu, cerrado em regeneração desde 1984 e um arboreto criado em 1978. Já a Estação Experimental é ocupada por plantios experimentais de *Pinus* spp e *Eucalyptus* spp e áreas administrativas da Fazenda.

O clima da região é caracterizado ser do tipo C_{Wa} de Köppen, úmido, mesotérmico, com pouco ou nenhum déficit hídrico e com grande excesso no verão (Struffaldi-De Vuono et al. 1986). Segundo dados de dez anos desses autores, a temperatura média anual fica em torno de 20,3^oC. Quanto aos solos, predominam os solos arenosos, profundos, ácidos, com pouca matéria orgânica e oligotróficos (Struffaldi-De Vuono et al. 1986)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Amostragem dos indivíduos

Duas populações naturais da espécie *Machaerium villosum* foram demarcadas no local de estudo (Figura 1).

A primeira na gleba “A” da Reserva Biológica, na região denominada Setor de Pesquisa Não Perturbatória-1 (SPNP-1). Segundo Struffaldi-De Vuono et al. (1982), o SPNP-1, tem uma área total de 101,17 ha, encontrando-se pouco invadido e com uma variação vegetal desde cerrado até mata. Nessa área a altitude média é 600 metros. Devido ao pouco grau de perturbação da área, esta população recebeu para efeitos de comparação a denominação de “modelo natural” (MN).

A outra população da espécie foi amostrada na Estação Ecológica de Mogi Guaçu, com uma área de 980,71 ha. A vegetação é composta por mata ciliar que acompanha o Rio Mogi Guaçu, gradando para mata mesófila, cerrado e várzeas. Essa área esteve sujeita a cortes seletivos e retirada da vegetação para implantação de culturas e pastagens (Eiten, 1963; Gibbs & Leitão Filho, 1978). Em alguns trechos da área, a vegetação fica sobre solos de planície de inundação (hidromórficos) e estão sujeitos a alagamentos periódicos na época de cheias do rio. Nessas áreas, costuma-se haver pouca diversidade de espécies, provavelmente devido ao estresse provocado pela inundação, exigindo das espécies a sua tolerância.

Considerando-se o grau de interferência e as condições naturais de estresse (alagamentos e inundações) nessa área, esta população recebeu a denominação de “modelo antrópico” (MA).

Em cada área amostral, delimitou-se uma região de ocorrência natural de *M. villosum*, a qual deveria conter pelo menos 30 indivíduos com diâmetro a altura do peito (DAP) igual ou superior a 10 cm. Este limite de DAP foi utilizado após uma verificação das populações e constatar-se que indivíduos com diâmetros iguais ou superiores a 10 cm já eram potencialmente reprodutivos.

A marcação dos indivíduos adultos seguiu uma padronização, segundo a qual estabelecia-se o primeiro indivíduo e a partir deste, todos os indivíduos que fossem encontrados eram marcados. A direção a seguir era oposta a uma barreira, natural ou não. No caso da população “MN” a barreira era uma estrada municipal e um talhão de *Pinus* spp. e na população “MA” uma construção seguida de um campo aberto úmido (várzea) com trechos em regeneração. Com este procedimento evitava-se que indivíduos vizinhos aos indivíduos amostrados interferissem nos resultados.

Utilizando-se de uma trena de 100 metros e uma bússola, anotava-se na caderneta de campo a distância e a direção entre uma árvore e outra. Além disso, com a trena, cada indivíduo tinha sua circunferência a altura do peito (CAP) anotada. Esta medida era depois convertida para DAP. A altura de cada indivíduo adulto foi estimada a partir de comparações visuais.

Na população “MN”, conseguiu-se 29 indivíduos adultos, porém, dois indivíduos com DAP inferior a 10 cm, foram incluídos entre os adultos, totalizando portanto, 31 indivíduos, considerando que estes indivíduos estavam no mesmo estágio de desenvolvimento do restante da população (árvores de grande porte que atingiam o dossel). A área aproximada que os indivíduos adultos desta população ocupam é 3 hectares. Esta área foi calculada por meio da plotagem dos indivíduos em papel milimetrado A-4 em escala conhecida, delimitando e dividindo a área em figuras geométricas. Das figuras geométricas, procedia-se ao cálculo da área usando as relações geométricas, totalizando todas as figuras por meio de soma.

Quanto a população “MA”, conseguiu-se 26 indivíduos adultos em uma área aproximada de 300 hectares. Tal como feito na população “MN”, nesta população fez-se uma varredura à procura de indivíduos adultos da espécie em estudo. Como as matas desta população margeiam o Rio Mogi Guaçu, no cálculo da área,

multiplicou-se a maior distância entre um indivíduo amostrado e a margem do rio (1000 metros) pela distância entre as árvores limites da população amostrada (3000 metros).

A maior distância entre um indivíduo e o rio foi obtida por estimativa. A distância entre as árvores limites foi obtida por medição indireta utilizando-se de um programa computacional (AUTOCAD). As localizações dessas árvores foram obtidas por meio de suas coordenadas geográficas utilizando-se de um GPS (*Global Positioning System*), as quais depois de plotadas em uma escala dentro do programa computacional, obtinha-se a distância entre elas.

Embora a distância média entre indivíduos adultos de *M. villosum* na Estação Ecológica situe-se na faixa de várias dezenas a poucas centenas de metros, nos trechos em que a ocorrência de inundação é um fato provável a intervalos de tempo indeterminados, pôde-se constatar a formação de grupos de indivíduos da espécie de diversos diâmetro e altura, formando pequenas reboleiras. Nesses espaços, invariavelmente notava-se a presença de um indivíduo de grande porte e a partir dele, a presença de regeneração abundante. Esse padrão de distribuição dos indivíduos nas reboleiras, sugeriu a idéia de colônias formadas a partir de um a poucos indivíduos fundadores, geralmente um a três indivíduos adultos, decidindo-se considerar no processo amostral dessa população, também os indivíduos jovens e as reboleiras.

Desta forma, duas reboleiras, as quais acreditava-se terem se formado a partir de dois indivíduos adultos, respectivamente a árvore 2 e a 12 da população “MA” foram amostradas. Nessas reboleiras, portanto, todos os indivíduos, independente do DAP ou altura foram incluídos na amostragem.

3.2.2. Determinação do protocolo enzimático

O método de caracterização genética da espécie usado neste trabalho foi a eletroforese de isoenzimas, seguindo as técnicas mais comuns utilizadas, particularmente os métodos descritos em Brewbaker et al. (1968), Soltis & Soltis (1989), Kephart (1990) e Alfenas et al. (1991). Todo o trabalho de laboratório foi realizado no LARGEA - Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (LCF/ESALQ/USP), em

Piracicaba, SP.

Alguns testes preliminares foram aplicados ao *M. villosum*, visando-se obter o tempo e a temperatura ideal de armazenamento do material, a solução de extração, os tampões de cuba/gel e os sistemas enzimáticos. A combinação das condições ideais de cada fator, possibilita um melhor planejamento de coleta, transporte e armazenagem do material e melhor resolução das enzimas.

Nestas atividades utilizou-se material oriundo de mudas formadas a partir de sementes da própria área de estudo e de indivíduos estabelecidos no *campus* da ESALQ/USP.

Foram testados 19 sistemas enzimáticos (Tabela 5) em três tipos de tampões de extração quais foram o utilizado por Gandara (1995) em folhas de *Cedrela fissilis*, o descrito em Paiva (1992) para *Hevea brasiliensis* e o de Souza (1997) em *Chorisia speciosa* e quatro sistemas tampão de cuba/gel (Tabela 6). Procurou-se testar o maior número de combinações possível entre os sistemas e os demais fatores de variação na resolução da enzima (extrator, tampão eletrodo/gel). Porém, a medida que determinados sistemas não apresentavam resolução alguma para as combinações, foram sendo descartados, optando-se por investir, ou seja, aperfeiçoar aqueles que mostravam alguma possibilidade de utilização no estudo. A maioria das enzimas do grupo das desidrogenase não mostrou resolução alguma.

Assim, o protocolo determinado para *M. villosum* Vog. utilizava o tampão de cuba e gel Tris-Citrato (TC), na concentrações apresentadas na Tabela 6, a solução de extração utilizada em Paiva (1992) e os sistemas enzimáticos α -EST, 6PGDH, PGI, IDH, MDH, PRX e SKDH, conforme receitas citadas nas Tabelas 7 e 8.

3.2.3. Coleta e transporte das amostras

A realização das coletas efetivou-se no início do mês de Agosto de 1997.

Amostras foliares de todos os indivíduos em cada população foram colhidas e acondicionadas em sacos plásticos transparentes identificados por indivíduo. Ao final de cada dia de coleta todo o material era guardado em geladeira a 5 °C. Procurou-se na coleta tomar amostras foliares homogêneas, coletando-se em cada indivíduo, folhas que estivessem no mesmo estágio vegetativo, posição na planta e com boa condição nutricional. Alguns indivíduos mais jovens, porém, só

apresentavam folhas novas, tendo sido estas então colhidas. Para obter-se estas condições, procurou-se colher folhas da faixa intermediária da copa das árvores.

Ao término das coletas o material foi acondicionado em caixas de isopor contendo gelo no fundo e camadas de papel jornal para evitar o contato direto com as folhas, transportado para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP e armazenado por dois dias em geladeira a 5 °C.

Tabela 5. Sistemas enzimáticos testados em *M. villosum* Vog. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 1999. E.C. = Enzyme Commission.

Enzima	Sigla	Referência (E.C.)
Álcool Desidrogenase	ADH	E.C. 1.1.1.1
Aldolase	ALD	E.C. 4.1.2.13
Alfa-Esterase	α -EST	E.C.3.1.1.1
Beta-Esterase	β -EST	E.C. 3.1.1.1
Catalase	CAT	E.C. 1.11.1.6
Fosfatase Ácida	ACP	E.C. 3.1.3.2
Fosfoglucomutase	PGM	E.C. 2.7.5.1
6-Fosfogluconato Desidrogenase	6PGDH	E.C. 1.1.1.44
Fosfoglucoase Isomerase	PGI	E.C. 5.3.1.9
Glicerato-2 Desidrogenase	G2DH	E.C. 1.1.1.29
Glucose-6-Fosfato Desidrogenase	G6PDH	E.C. 1.1.1.49
Glucose Desidrogenase	GLUDH	E.C. 1.1.1.47
Glutamato-Oxalacetato Transaminase	GOT	E.C. 2.6.1.1.
Isocitrato Desidrogenase	IDH	E.C. 1.1.1.42
Leucina Aminopeptidase	LAP	E.C. 3.4.11.1
Malato Desidrogenase	MDH	E.C. 1.1.1.37
Manitol Desidrogenase	MADH	E.C. 1.1.1.67
Peroxidase	PRX	E.C. 1.11.1.7
Xiquimato Desidrogenase	SKDH	E.C. 1.1.1.25

Tabela 6. Sistemas de tampão eletrodo/gel para eletroforese de isoenzimas, testados em *M. villosum* Vog. Piracicaba-SP, ESALQ/USP. 1999.

Sistema	Tampão eletrodo	Tampão gel	Referência
Citrato morfolina (CM)	Ácido cítrico 8,4 g/l titular com N-(3-aminopropil) morfolina até pH 6,1	Diluição 1:20 do tampão do eletrodo	Clayton & Tretiak, 1972
Histidina	Trizma-base 18,2 g/l Ácido cítrico 10,2 g/l ajustar o pH a 6,6 com HCl	Histidina 10,5 g/l ajustar o pH a 6,6 com Tris 1 molar	Paiva (1992)
Tris-citrato (TC)	Trizma-base 27,0 g/l Ácido cítrico 18,0 g/l ajustar o pH a 7,5 com NaOH	Diluição a 3,5% do tampão do eletrodo	Alfenas et al (1991)
Tris-citrato bórico (TCB)	Ácido bórico 0,3 M ajustar pH a 8,3 com NaOH 4N	Tris/ácido cítrico pH 8,6	

Tabela 7. Solução de extração utilizada em *M. villosum* Vog., extraída de Paiva (1992). Piracicaba-SP, ESALQ/USP. 1999.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO
Trizma base	0,07 M
Cisteína	0,01 M
pH 7,3	

3.2.4. Preparo das amostras e extração das enzimas.

Das amostras foliares dos indivíduos procedeu-se a extração das enzimas, as quais foram extraídas a um só tempo, levando cerca de dois dias. Na extração, uma pequena parte de aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar era retirado e macerado com o auxílio de um bastão de vidro em placas de porcelana, sobre barras

de gelo. Aproximadamente 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polyvinil Pirrolidone (PVP 40) e 7 mg de Polyvinil Pirrolidone (PVP 360) eram adicionados às células da placa de porcelana, com objetivo de facilitar a maceração. Duas a três gotas de solução de extração (cerca de 300 microlitros) utilizada por Paiva (1992) (Tabela 7) eram também colocadas, sendo então a solução extraída individualmente, em que se continha a enzima, absorvida em pedaços de papel de filtro (Whatman nº 3) com dimensão de 6 x 10 mm (*wicks*) e colocados em *eppendorf*.

Cada *eppendorf* recebeu de 2 a 3 *wicks* com a enzima de um indivíduo, sendo devidamente identificado e replicado, ou seja, dois *eppendorfs* de cada indivíduo foram preparados, levando-se à armazenagem em freezers a -20 °C e -80 °C, respectivamente, em lotes de vinte unidades.

3.2.5. Preparo dos géis

Os géis eram sempre preparados no dia anterior ao da corrida, pois o preparo com muita antecedência causa o ressecamento do gel.

No preparo do gel, 350 ml do tampão eram misturados com aproximadamente 46 g de penetrose em um kitasato e levados ao fogo sob agitação constante em agitador mecânico durante cerca de 15 minutos, até a solução ficar translúcida. Em seguida fazia-se a desaeração e colocava-se em fôrma de vidro temperado, previamente montada nas dimensões 20 cm x 13 cm x 0,8 cm. Após o esfriamento do gel, colocava-o em geladeira a 5 °C, devidamente protegido por uma placa de vidro para evitar o ressecamento.

3.2.6. Procedimento de Eletroforese

A eletroforese de isoenzimas utilizada foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%. Cada gel acondicionava amostras de 20 indivíduos. Nos dias de corrida, fazia-se um corte longitudinal a cerca de dois centímetros de uma das bases do gel, afastando-se as partes cerca de 1 cm, necessário à colocação dos *wicks*. Em ambas as extremidades do gel, um *wick* colorido com a solução azul de bromofenol a 0,1% era colocado com a finalidade de marcar a distância máxima possível de migração das enzimas durante o processo eletroforético.

A seguir iniciava-se a colocação da esquerda para a direita, dos *wicks*

contendo as enzimas do *M.villosum*. Juntavam-se as partes novamente com o auxílio de uma tira de acrílico, fechava-se a fôrma com fita adesiva e então colocava-se sobre as cubas, em que panos Perfex faziam a ligação entre o gel e o eletrodo.

Para cada corrida, um lote de *eppendorfs* do freezer a -20°C era retirado, sendo os indivíduos identificados em ficha de controle, e realizada a corrida em geladeira a cerca de 5°C , adicionando-se sobre o gel placas de vidro e cuba de gelo, as quais visavam evitar o superaquecimento provocado pelo atrito no processo de migração das enzimas.

A corrente elétrica nos primeiros 30 minutos de corrida permanecia constante em 32 a 35 mA, sendo posteriormente elevada a 40 mA até o final do processo. A voltagem nos eletrodos variou de 180 a 240 volts e no gel de 13 a 21 volts nos primeiros 30 minutos e 200 a 250 e 15 a 30 volts no eletrodo e no gel, respectivamente, para o restante do tempo de corrida. Após os 30 minutos iniciais da corrida, os *wicks* contendo as amostras eram retirados.

O tempo médio de corrida era 8 horas, em que neste momento o marcador de azul de bromofenol atingia a migração de 8,0 a 8,5 cm.

3.2.7. Coloração

Ao término da corrida, os géis eram cortados em seis fatias de aproximadamente 1 mm de espessura, sendo a primeira e a última descartadas. As fatias restantes eram submetidas a coloração em enzimas específicas. Às fatias de géis, acondicionadas em cubas de porcelana, se adicionava os reagentes de coloração específicos de cada enzima, submetia-os ao escuro por meio de placas de vidros cobertas com papel alumínio colocadas sobre as cubas e então as levava à estufa, com temperatura média de 37°C .

Algumas variações deste procedimento foram usadas para os sistemas α -esterase (α -EST) e peroxidase (PRX). No primeiro, duas soluções “A” e “B” eram preparadas. A solução “A” era obtida pela diluição do substrato em acetona a 50%, adicionando em seguida o tampão de coloração. O gel era imergido por 20 minutos nessa solução e levado sob escuro à estufa.

Findo o período de incubação, a solução “B”, obtida pela diluição do substrato em n-propanol e posterior mistura com o tampão de coloração, era adicionada sobre o gel e novamente incubada até o aparecimento das bandas.

No sistema peroxidase (PRX), o substrato diluído em etanol e no tampão de coloração era adicionado ao gel, levando-se para a incubação por 30 minutos. Depois disso, 1 ml de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% era misturado à solução. Após esta operação as bandas apareciam em cerca de 2 minutos.

O tempo médio para aparecimento das bandas, para os demais sistemas, variava de 30 minutos para sistemas como MDH, PGI, α -EST até 90-120 minutos para os sistemas 6PGDH e SKDH. Não era raro, deixar estes dois últimos sistemas repousando em estufa durante toda a noite, para posterior retirada na manhã do dia seguinte.

O sistema IDH, apesar de se mostrar promissor no protocolo, não foi bem nas corridas definitivas, sendo seu uso abandonado logo nos primeiros dias de corrida.

Após o surgimento das bandas, os géis eram retirados, lavados em água corrente e o excesso de reagente sugado com um succionador elétrico.

3.2.8. Interpretação dos zimogramas

A interpretação dos zimogramas era feita no mesmo dia da corrida, logo após a lavagem dos géis, momento em que as bandas eram mais nítidas e sem borrões. A identificação das zonas codificadoras dos locos e dos alelos era feita a partir da região mais catódica para a mais anódica. Assim, por exemplo, em um sistema enzimático em que duas bandas eram claramente identificadas, a que migrou mais no gel recebia a denominação de loco-1 e a outra banda era chamada loco-2.

Da mesma forma procedeu-se em relação aos alelos de cada loco. O alelo mais catódico era denominado 1 e a partir dele os outros eram identificados sequencialmente. A interpretação de cada sistema enzimático foi realizada seguindo os padrões descritos nos trabalhos do gênero (Weenden, 1983; Soltis & Soltis, 1989; Kephart, 1990; Alfenas et al., 1991).

Depois da identificação dos zimogramas, os géis eram identificados quanto ao sistema enzimático, datados e fotografados em filmes coloridos ASA 100. Após a revelação dos filmes, fazia-se a confirmação das leituras dos zimogramas.

Tabela 8. Sistemas enzimáticos utilizados para o estudo genético de *M. villosum* Vog. Piracicaba-SP, ESALQ/USP. 1999.

α -EST	6PGDH	PGI	IDH	MDH	PRX	SKDH
Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0	50 ml	50 ml	50 ml			
Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5	-----	-----	-----	50 ml	-----	50 ml
Tampão Acetato de Sódio 0,1 M pH 4,5	-----	-----	-----	-----	50 ml	-----
Tampão Fosfato de Sódio 0,05 M pH 6,0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Etanol	-----	-----	-----	-----	25 ml	-----
Substrato ●-naftil acetato 40 mg	Ácido 6-fos-foglucônico 20 mg	Fructose 6-phosfato 30 mg	DL-ácido isocitríco 100 mg	DL-ácido málico 0,5 M pH 8,0 4 ml	O-dionisidina bi-HCl 30 mg	Ácido xiquímico 60 mg
Catalisador MgCl ₂ (10 mg/ml H ₂ O)	1 ml	1 ml	1 ml	-----	-----	-----
Cofator	NADP ⁺ 10mg	NADP ⁺ 10mg	NADP ⁺ 10mg	NAD-10 mg	-----	NADP ⁺ 10mg
MTT	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg	-----	10 mg
PMS	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg	-----	1 mg
Outros Fast Garnet GBC 30 mg	-----	glucose 6-phosfato 10 µl	-----	-----	H ₂ O ₂ (3%) 1 ml	-----

3.2.9. Análise dos dados

3.2.9.1. Caracterização da variação genética intrapopulacional

Em cada população procedeu-se a caracterização da variação genética pela estimativa das frequências alélicas e dos índices de diversidade (heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada segundo as expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, número de alelos por loco e porcentagem de locos polimórficos) segundo Brown & Weir (1983) e Nei (1987). Foi considerado polimórfico o loco em que a frequência do alelo mais comum não excedesse a 0,99.

O programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989) foi empregado na obtenção das estimativas. Este programa fornece ainda os índices de fixação de Wright ao nível de loco, média entre os locos e média entre as populações.

Empregou-se o teste de qui-quadrado de contingência conforme discutido em Workman & Niswander (1970) na comparação das frequências alélicas entre populações. As comparações basearam-se nos valores de F_{ST} , em que a hipótese nula (h_0) é F_{ST} igual a zero, o que possibilita testar a hipótese de existência ou não de divergência entre as populações.

A variável χ^2 para este teste foi calculada conforme Workman & Niswander (1970):

$$\chi^2 = 2N\hat{F}_{ST}(k-1) \text{ com GL} = (k-1)(s-1) \text{ em que}$$

N = tamanho médio da amostra

k = número de alelos

s = número de subpopulações ou divisões

GL = graus de liberdade.

3.2.9.2. Estrutura genética populacional

Para a caracterização da estrutura genética das populações estudadas, utilizou-se o método das estatísticas F de Wright.

Conforme já descrito, a abordagem da estrutura genética tem sido estudada por três metodologias distintas, porém complementares: os coeficientes de coancestralidade de Cockerham, os índices de diversidade gênica de Nei e as estatísticas F de Wright.

Não foi utilizado o primeiro método, apesar de suas vantagens como já

apontadas em Vencovsky (1992), Weir (1996) e Reis (1996), devido aos poucos níveis hierárquicos contidos neste estudo.

Algumas simulações com os dados obtidos neste trabalho foram feitas (dados não publicados) para a obtenção dos índices de diversidade de Nei, principalmente no método do desdobramento da diversidade, porém, os resultados, sobretudo o G_{ST} , importante na estimativa do fluxo gênico e na definição de estratégias de conservação e coleta de germoplasma, foram semelhantes às estatísticas F, motivo pelo qual optou-se por este método.

3.2.9.3. Aderência das freqüências genotípicas ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e ao Equilíbrio de Endogamia Neutro de Wright (EENW).

Visando verificar se as freqüências genotípicas observadas em cada loco de cada população, desviavam-se das esperadas pelo equilíbrio do teorema de Hardy-Weinberg, aplicou-se um teste qui-quadrado, utilizando-se o programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989).

A variável χ^2 neste teste, é dado por, conforme Gomes (1976, 1990) e Weir (1996):

$$\chi^2 = \sum (|fo - fe| - 0,5)^2 / fe \text{ em que}$$

fo = freqüência genotípica observada

fe = freqüência genotípica esperada.

A subtração de 0,5 no numerador refere-se ao fator de correção de continuidade de Yates (Gomes, 1990). Segundo Weir (1996), o uso da correção de continuidade serve para superar o problema do uso de uma variável de distribuição contínua, no caso o χ^2 , para um teste de hipóteses com contagem genotípicas discretas.

Algumas observações quanto aos dados devem ser consideradas na aplicação deste teste. Gomes (1990) aponta que a freqüência esperada mínima não deve ser menor que um e em apenas alguns casos menor que cinco. Sokal & Rohlf (1981) dizem que as freqüências esperadas não devem ser inferiores a cinco até o limite de 20% das classes.

Tendo em vista estes pressupostos, o programa BIOSYS-1 executa três modos para o cálculo da significância dos desvios entre as freqüências observadas e esperadas.

O primeiro teste é um qui-quadrado calculado com as classes genótípicas reais ou individualizadas. No caso de em algum loco haver classes de genótipos, cujas frequências não se ajustem aos pressupostos do teste, é realizado então, para estes locos, um segundo teste qui-quadrado, no qual as classes são agrupadas segundo a frequência do alelo mais comum.

O agrupamento então reúne três classes: 1ª a do número de homozigotos para o alelo mais comum; 2ª a do número de heterozigotos entre o alelo mais comum e os raros e 3ª a do número de homozigotos raros e outros heterozigotos.

O terceiro teste executado pelo programa é o teste de probabilidade exato de Fisher. Segundo Weir (1996) as propriedades deste teste foram notadas por Fisher⁶ (1934) em que uma amostra observada poderia ser usada para rejeitar uma hipótese, se a probabilidade total ou a menos provável sob a hipótese daquela amostra fosse pequena.

Os testes exatos são geralmente usados para amostras de pequenos tamanhos, quando há uma maior chance de ocorrer números esperados pequenos no teste qui-quadrado (Weir, 1996).

Para um loco com dois alelos, A e a, Weir (1996) demonstra que sob a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg, a probabilidade das frequências genótípicas observadas, dadas as frequências alélicas de A e a, é:

$$\Pr(n_{AA}, n_{Aa}, n_{aa} | n_A, n_a) = \frac{n! n_A! n_a! 2^{n_{Aa}}}{n_{AA}! n_{Aa}! n_{aa}! (2n)!}$$

em que n é o tamanho da amostra, n_{AA} , n_{Aa} e n_{aa} são as frequências genótípicas observadas dos genótipos AA, Aa e aa, respectivamente e n_A e n_a são as frequências gênicas dos alelos A e a, respectivamente.

Assim, o teste de hipótese não é rejeitado sempre que a probabilidade (Pr) exceder o nível de significância (α).

Pela ordem, priorizou-se o qui-quadrado sem agrupamento ou real, seguindo o qui-quadrado com agrupamento de classes quando os pressupostos do primeiro estivessem inadequados e por fim o teste de probabilidades exato de Fisher.

Quando a hipótese nula de equilíbrio de Hardy-Weinberg era rejeitada para um loco qualquer, a este procedeu-se o teste de equilíbrio de endogamia neutro de Wright (EENW).

⁶ Fisher, R.A. Statistical Methods for Research Workers. Oliver and Boyd, Londres. 1934

A variável χ^2 para este teste foi estimada conforme Vencovsky (1994):

$$\chi^2 = \sum (n_o - n_e)^2 / n_e$$

em que n_o é a frequência genotípica observada e n_e é a frequência genotípica esperada.

No cálculo da frequência genotípica esperada, pressupondo equilíbrio de endogamia, considera-se o índice de fixação ao nível de loco estimado por (Vencovsky, 1994):

$$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e}$$

$\hat{H}_o$ = heterozigosidade observada

$\hat{H}_e$ = heterozigosidade esperada segundo o EHW.

Assim, as frequências esperadas dos genótipos em equilíbrio de endogamia, são dadas por (Weir, 1996):

$$P_{uu} = p_u^2 + p_u(1 - p_u)\hat{f}$$

$$P_{uv} = 2p_u p_v(1 - \hat{f})$$

sendo

P_{uu} = frequência esperada dos homozigotos $A_u A_u$;

P_{uv} = frequência esperada dos heterozigotos $A_u A_v$;

p_u = frequência do alelo A_u ;

p_v = frequência do alelo A_v e

$\hat{f}$ = índice de fixação alélica ao nível de loco.

Os graus de liberdade são dados por:

$$GL = [(n^o \text{ de genótipos} - 1) - (n^o \text{ de alelos} - 1) - 1],$$

sendo um grau de liberdade perdido devido ao $\hat{f}$ (Vencovsky, 1994). Portanto, este teste só pode ser aplicado em locos que possuam pelo menos três alelos.

3.2.9.4. Análise das populações

A análise da estrutura genética populacional a partir dos F's, foi realizada por comparações das populações, duas a duas, totalizando quatro comparações, a saber:

- a) População MN (total) x População MA (total)
- b) População MN (total) x População MA (adultos)
- c) População MA (adultos) x População MA (jovens)

d) População MA (Reboleira 2) x População MA (Reboleira 12).

A população MN foi amostrada apenas por seus indivíduos adultos. Então em qualquer comparação que inclua esta população, referir-se-á a totalidade dos seus indivíduos. Já na população MA, os indivíduos amostrados foram classificados segundo o diâmetro em jovens e adultos. Assim, a população MA_{total} inclui todos os indivíduos desta população, ao passo que MA_{adultos} e MA_{jovens}, incluem apenas os indivíduos das categorias mencionadas.

As reboleiras da população MA, incluem indivíduos de qualquer categoria, contanto que estes estejam na área de domínio da reboleira. As reboleiras são definidas por uma área geográfica, limitada pela ocorrência de indivíduos de *M. villosum*. Geralmente o padrão aparente de formação destas reboleiras é o de uma a poucas árvores adultas de *M. villosum* (provavelmente árvores-mães) e a partir destas um abundante “*stand*” de indivíduos da espécie com altura e diâmetro variáveis.

Assim, a reboleira 2 é um *stand* de indivíduos da espécie, supostamente originada da árvore adulta 2 na amostragem da população MA. O mesmo pressuposto é válido para a reboleira 12.

A comparação entre as populações MN e MA visou verificar se há divergência entre elas. Nas comparações internas da população MA o objetivo era verificar principalmente se havia heterogeneidade dos adultos para os jovens.

As comparações entre as reboleiras visavam confirmar as previsões de maior endogamia dentro destes grupos.

Os valores F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} foram obtidos em cada conjunto de comparações, conforme Nei (1987) utilizando-se o programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989). Os valores de F_{IS} e F_{IT} ao nível de loco foram submetidos ao teste qui-quadrado proposto por Li & Horvitz (1953):

$$\chi^2 = NF^2 (k-1) \text{ com } k(k-1)/2 \text{ graus de liberdade.}$$

N = tamanho médio da amostra no caso do F_{IS} e tamanho da amostra considerando toda a população no caso do F_{IT} ;

F = estatísticas F_{IS} ou F_{IT} conforme o caso;

k = número de alelos.

A variável χ^2 obtida desta forma, testa a hipótese de $F=0$.

Para o valor médio dos F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} entre os locos, utilizou-se o teste Z , segundo Loiselle et. al. (1995) em que,

$$Z = \frac{(\bar{f} - 0)}{\hat{\sigma}_{\bar{x}}}$$

$\bar{f}$ = média das estatísticas F_{IS} , F_{ST} ou F_{IT} conforme o caso para todos os locos;

$\hat{\sigma}_{\bar{x}}$ = desvio padrão da média obtido por

$$\hat{\sigma}_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\hat{\sigma}_{\bar{f}}^2}{n}} \text{ em que}$$

$\hat{\sigma}_{\bar{f}}^2$ = variância entre os F's

n = número de observações.

Tendo a variável Z, uma distribuição normal padrão com média zero e variância um, o teste de hipótese é rejeitado quando o valor calculado para a variável superar a 1,96 ou 2,58 ($\alpha = 0,05$ ou $0,01$, respectivamente).

3.2.9.5. Taxa de cruzamento

Estimou-se a taxa de fertilização cruzada a partir da frequência de heterozigotos, segundo a expressão dada em Paiva (1992):

$$\hat{t} = \frac{(1 - \hat{f})}{(1 + \hat{f})} \text{ em que,}$$

$\hat{t}$ = taxa de estimada de fertilização cruzada;

$\hat{f}$ = coeficiente de endogamia dentro das populações, equivalente ao F_{IS} .

A taxa de cruzamento (t) foi estimada em cada loco estudado e em seu valor médio.

3.2.9.6. Fluxo gênico

As estimativas do fluxo gênico foram obtidas segundo a equação proposta por Crow & Aoki (1984), segundo a qual,

$$Nm = \frac{(1/G_{ST}) - 1}{4\alpha} \text{ sendo}$$

$$\alpha = [n/n - 1]^2 \text{ em que}$$

Nm = número de migrantes

n = número de populações,

porém, utilizando o F_{ST} em lugar do G_{ST} . Estimou-se o tamanho de vizinhança

segundo a relação $N_b = 2\pi N_m$ e a área de vizinhança por $A = N_b/d$ em que d é a densidade dos indivíduos.

3.2.9.7. Autocorrelação espacial

A análise de autocorrelação espacial (Sokal & Oden, 1978) foi utilizada para investigar a estrutura genética espacial das populações naturais MA e MN de *Machaerium villosum* Vog.

Como a distância entre os indivíduos variava entre poucos centímetros até várias centenas de metros, não era possível localizar todos os indivíduos em uma escala geométrica, pois, escalas muito grandes seriam suficientes para captar diferenças de distâncias pequenas, porém, não conseguiria-se localizar indivíduos mais distantes. Por outro lado, usando-se escalas menores, os indivíduos mais espaçados seriam representados, contudo, indivíduos muito próximos ocupariam todos um mesmo ponto geográfico.

Portanto, para a localização dos indivíduos dentro das populações, utilizou-se equipamento de DGPS (*Differential Global Positioning System*) que consiste de um receptor móvel para medições em campo e de um receptor fixo, por meio do qual se faz correções nas posições tomadas em coordenadas geográficas de latitude e longitude, utilizando-se o sistema global WGS 84, com *Datum* UGGI-79 e convertidas posteriormente para o sistema de coordenadas UTM (*Universal Transverse Mercator*), fuso 23, com o *Datum* SAD-69.

Essa conversão permitiu a entrada dos dados de posicionamento de todos os indivíduos em um sistema CAD (*Computer Aided Design*), no caso o AUTOCAD. Desta forma, todos os indivíduos foram mapeados dentro de um mesmo sistema de projeção.

A análise de autocorrelação espacial foi realizada para os locos polimórficos de cada população, segundo a abordagem descrita por Heywood (1991). Nesta abordagem, para cada alelo, indivíduos são caracterizados por frequências alélicas de 0, 0.5 ou 1, conforme eles carreguem nenhuma, uma ou duas cópias do alelo em seus genótipos, respectivamente.

Em cada loco polimórfico apenas os dois alelos mais frequentes foram considerados na análise, exceto quando o loco era dialélico e portanto, apenas um alelo era analisado pois, o outro tinha frequência dependente.

Três métodos de conexão foram empregados: a conexão de Gabriel, o vizinho mais próximo e classes de distância. Este último possibilitou a construção dos correlogramas alélicos.

O coeficiente de autocorrelação denominado I de Moran foi calculado para os três métodos de conexão, segundo a expressão

$$I = \frac{n \sum_{ij} w_{ij} z_i z_j}{W \sum_{i=1}^n z_i^2} \text{ em que,}$$

$z_i = x_i - \bar{x}$, em que x_i é o valor da variável x para a localidade i e $\bar{x}$ é a média de x para todas as localidades;

w_{ij} = peso dado à ligação entre as localidades i e j ;

$W = \sum w_{ij}$.

Nos métodos da conexão de Gabriel e vizinho mais próximo utilizou-se o programa de computador “*Autocorr*” feito por J.S.Heywood, para a obtenção das estimativas de I , o desvio padrão de I e o desvio padrão normal, em cada loco e para cada alelo analisado.

Como os valores do desvio padrão de I são assintoticamente gaussianos, a significância de I era obtida pelo desvio padrão normal, sendo significativo aos níveis de probabilidade de 0,05 e 0,01, sempre que excedesse a 1,96 ou 2,58, respectivamente.

No método por classes de distância, utilizou-se o programa “SAAP - *Spatial Autocorrelation Analysis Program*”, versão 4.3, desenvolvido por Daniel Wartenberg.

O número de classes de distância analisado foi determinado em função do número de conexões em cada classe, estabelecendo-se um número mínimo de trinta conexões por classe.

Assim na população MA, dez classes de distância que satisfizeram aquelas premissas foram delineadas. As classes foram: classe 1) 0-5 m; 2) 5-10m; 3) 10-20m; 4) 20-30m; 5) 30-50m; 6) 50-150m; 7) 150-1000m; 8) 1000-2500m; 9) 2500-3000m e 10) 3000-3200m.

Nesta população ainda foi aplicada a análise de autocorrelação aos indivíduos da reboleira 2 apenas, pois devido a proximidade entre os indivíduos suspeitava-se

da existência de estruturação. A análise de autocorrelação espacial aplicada na reboleira 2 pelo método de classes de distância teve as seguintes classes: 1) 0-5m; 2) 5-10m; 3) 10-15m; 4) 15-20m; 5) 20-25m; 6) 25-30m; 7) 30-35m; 8) 35-50m; 9) 50-120m e 10) 120-190m.

Na população MN, considerando o número mínimo de trinta conexões em cada classe de distância, somente cinco classes foram executadas, exceto para os alelos dos locos 6Pgdh e Skdh, em que quatro classes de distância foram analisadas.

As classes de distância desta população foram: 1) 0-50m; 2) 50-80m; 3) 80-120m; 4) 120-170m e 5) 170-335m. A classe de distância quatro dos locos 6Pgdh e Skdh corresponde ao intervalo de distância entre 120 e 335 metros.

Em cada classe de distância para cada população analisada e para a reboleira 2 da população MA, foi calculado um coeficiente de autocorrelação I de Moran.

A significância dos I's em cada classe foi obtida pela transformação do desvio padrão do valor observado de I em relação a sua expectativa em desvio padrão normal. Assim, a significância indica uma autocorrelação positiva ou negativa em relação a expectativa de ausência de autocorrelação, demonstrando uma maior ou menor similaridade naquela classe de distância do que seria esperado por mero acaso, considerando este o único fator determinante da distribuição espacial do alelo analisado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amostragem dos indivíduos

As características das populações amostradas estão demonstradas na tabela 9.

Na população “MN”, 31 indivíduos adultos foram amostrados, porém incluiu-se dois indivíduos abaixo do limite de 10 cm, os quais tinham um diâmetro em torno de 8 cm, sendo classificados como adultos. Não houve indivíduos jovens na área amostral dessa população. A área aproximada ocupada por estes indivíduos foi três hectares, o que significa um número médio de 10 indivíduos adultos por hectare.

Na população “MA”, 26 indivíduos adultos e 93 jovens foram amostrados. Entre os adultos, o maior diâmetro amostrado foi 70,66 cm e o menor 10,19 cm e entre os jovens essa amplitude foi 9,23 cm, sendo o maior valor 9,71 cm e o menor 0,48 cm.

Esta população ocupou uma faixa contígua ao longo do Rio Mogi Guaçu, com cerca de 300,00 hectares, o que dá uma média de 0,09 (26 indivíduos adultos/300 ha) indivíduos adultos por hectare ou 1 indivíduo a cada 11 hectares. Este parâmetro pode estar superestimado em função da área ter sido modificada, e portanto, não há como relacionar esta medida com a mata natural.

Porém, dado que a área “MN” levantada foi uma parcela pequena da floresta quando se considera a raridade das espécies tropicais, não é possível por este modelo, afirmar que a densidade natural do *M. villosum* seja tão alta quanto a apurada naquela área. Mais razoável, porém, é a confirmação da tendência ao agrupamento da espécie e consequentemente, a sua classificação em espécie rara agrupada com a densidade global muito baixa. Estudos posteriores devem ser conduzidos para confirmar esta hipótese.

Tabela 9. Caracterização das populações naturais de *M. villosum* amostradas na Reserva Biológica e Estação Ecológica de Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

CATEGORIA	POPULAÇÃO MN*	POPULAÇÃO MA
Adultos	n = 31 $\overline{dap} = 23,16 \pm 3,10$ cm $\overline{h} = 13,13 \pm 1,41$ m	n = 26 $\overline{dap} = 24,14 \pm 6,25$ cm $\overline{h} = 8,08 \pm 2,19$ m
Jovens		n = 93 $\overline{dap} = 3,24 \pm 0,53$ cm $\overline{h} = 2,52 \pm 0,21$ m
Total	n=31	n=119

*Nesta população foram incluídos dois indivíduos com *dap* de 8,59 cm e 7,96 cm, portanto, inferior ao limite de 10 cm.

Os intervalos de confiança das médias foram calculados com 95% de probabilidade.

A reboleira formada a partir da árvore 2 (*DAP* = 46,15 cm e *h* = 8 m) tem o formato de um semi-círculo, ocupa uma área de 1170 m², e contém 77 indivíduos, excluídos os adultos e a possível árvore-mãe, enquanto a da árvore 12 (*DAP*=20,05 cm e *h*=12 m) ocupa uma área aproximada de 550 m², contém 12 indivíduos dispersos entre a faixa oeste e norte da suposta árvore-mãe. A forma de amostragem dessas reboleiras está resumida na tabela 10.

Tabela 10. Caracterização das reboleiras de *M.villosum* amostradas na população “MA” da Estação Ecológica de Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

REBOLEIRA	Nº INDIVÍDUOS	$\overline{dap}$ (cm)	$\overline{h}$ (metros)	ÁREA(m ²)
2	77	2,82 ± 0,52	2,34 ± 0,19	1170
12	12	4,32 ± 1,52	3,28 ± 0,80	550

4.2 Os sistemas enzimáticos

Os seis sistemas enzimáticos (α -EST, MDH, 6PGDH, PGI, PRX e SKDH) mostraram uma resolução das bandas variável entre regular, para os sistemas 6PGDH e SKDH e muito boa para os demais sistemas (Figuras 2, 3 e 4). Nestes sistemas, conseguiu-se uma amostra de dez locos polimórficos.

As características demonstradas por cada sistema enzimático para os tecidos

foliares de *Machaerium villosum* Vog. foram:

- α -EST - (alfa-esterase) - apresentou duas zonas de bandejamento, porém apenas a mais catódica pôde ser interpretada com segurança. Nesta, a estrutura da enzima foi determinada monomérica, codificando um loco com três alelos.
- MDH (Malato desidrogenase) - este sistema demonstrou uma ótima resolução das bandas. Estrutura monomérica com distinção de três zonas de bandejamento. A banda mais catódica foi determinada como loco Mdh-1. Uma zona intermediária que confundia-se com o loco Mdh-1 foi interpretada e denominada como o loco Mdh-2. A última zona, a que menos migrou em gel, foi determinada como sendo o loco Mdh-3. Todos os locos apresentaram dois alelos.
- 6PGDH (6-Fosfogluconato desidrogenase) - Resolução apenas regular, estrutura monomérica, porém pôde-se identificar apenas uma zona codificadora, com quatro alelos.
- PGI (Fosfoglucoase isomerase) - Distinguiu-se duas zonas de bandejamento. A primeira mais catódica foi denominada como loco Pgi-1 e apresentava estrutura monomérica com dois alelos. A segunda, denominada loco Pgi-2, identificou-se dois alelos, porém com estrutura dimérica. A resolução deste sistema foi boa.
- PRX (Peroxidase) - De todos os sistemas, foi o que apresentou melhor resolução, possibilitando uma fácil interpretação. Três zonas de bandejamento foram visualizadas, duas catódicas e uma anódica. Das zonas com bandejamento catódico, apenas aquela que mais migrou pôde ser identificada, já que a outra mostrou-se um pouco borrada. Aquela zona foi denominada como o loco Prx-1, em que identificou-se três alelos. Na banda anódica, a zona codificadora foi denominada como o loco Prx-2, e dois alelos foram identificados. A estrutura enzimática foi determinada monomérica.
- SKDH (Xiquimato desidrogenase) - Assim como o sistema 6PGDH, este sistema também demonstrou uma resolução apenas regular. Contudo, uma zona de bandejamento catódica foi determinada, contendo três alelos. Estrutura monomérica.

Figura 2. Padrão de bandeamento dos sistemas α -EST e MDH em *Machaerium villosum* Vog. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 3. Padrão de bandeamento dos sistemas enzimáticos 6PGDH e PGI em *Machaerium villosum* Vog. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 4. Padrão de bandejamento dos sistemas enzimáticos PRX e SKDH em *Machaerium villosum* Vog. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

4.3 Variabilidade genética intrapopulacional

As frequências alélicas populacionais, obtidas em cada loco e os parâmetros de variabilidade genética estão demonstrados nas tabelas 11 e 12.

Considerando que o loco α -Est apresentou uma evidente diferença entre a heterozigosidade observada e a esperada sob panmixia, na tabela 12 optou-se por apresentar as médias dos índices de diversidade separadamente, ou seja, com a totalidade dos locos analisados e com a exclusão daquele loco.

Os dados de 10 locos enzimáticos demonstram que as frequências alélicas variaram tanto entre as populações quanto dentro de categorias dentro das populações, isto é, houve diferença de frequências gênicas entre os adultos e os jovens, considerando a totalidade dos locos.

Houve a ocorrência de dois alelos (o alelo 3 da Mdh-3 e o alelo 4 da 6Pgdh) apenas nas populações de jovens, embora em frequência muito baixa (0,032 e 0,007, respectivamente). Isto pode indicar que houve migração de alelos vindos de áreas não incluídas neste estudo. Na população “MN”, o alelo 2 do Mdh-3 está fixado. Este alelo também ocorre em frequência muito alta nas categorias da população “MA”. Embora isto possa sugerir uma vantagem adaptativa deste alelo, é mais razoável atribuir este fato aos efeitos da deriva genética.

A porcentagem de locos polimórficos variou de 90,00% para a população “MN” à 100,00% na população “MA”, qualquer que seja a categoria desta população. Em relação ao número de alelos por loco, houve uma variação de 2,40 a 2,70. O número inferior refere-se às populações adultas deste estudo. O número superior é conseguido quando os jovens são incluídos na amostragem. Naturalmente, esta diferença deve-se aos alelos exclusivos dos jovens. A diferença no polimorfismo das populações (limite de exclusão 0,99) é pelo fato do loco Mdh-3 encontrar-se totalmente fixado, porém, de qualquer modo, o *Machaerium villosum* apresenta um alto polimorfismo enzimático quando comparado a outras espécies arbóreas tropicais. O número de alelos por loco demonstra uma riqueza alélica igualmente alta.

Quando exclui-se os resultados do loco α -Est, a porcentagem de locos polimórficos cai de 90,00% para 88,89% na população “MN”. O mesmo ocorre com o número médio de alelos por loco que reduz de 2,40 para 2,33. Este resultado é

Tabela 11. Frequências alélicas e tamanho da amostra (n) em populações naturais de adultos e jovens de *M. villosum*, em Mogi Guaçu para 10 locos enzimáticos. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

LOCO	ALELO	POPULAÇÃO "MN"		POPULAÇÃO "MA"	
		ADULTOS	ADULTOS	JOVENS	AD+JOVENS
α -Est	1	0,021	0,022	0,047	0,041
	2	0,375	0,152	0,333	0,291
	3	0,604	0,826	0,620	0,668
	n	24	23	75	98
Mdh-1	1	0,148	0,083	0,071	0,073
	2	0,852	0,917	0,929	0,927
	n	27	24	85	109
Mdh-2	1	0,981	0,955	0,953	0,953
	2	0,019	0,045	0,047	0,047
	n	27	22	85	107
Mdh-3	1	0,000	0,063	0,013	0,022
	2	1,000	0,938	0,955	0,952
	3	0,000	0,000	0,032	0,027
	n	27	16	77	93
6Pgdh	1	0,056	0,042	0,101	0,093
	2	0,667	0,583	0,514	0,525
	3	0,278	0,375	0,377	0,377
	4	0,000	0,000	0,007	0,006
	n	18	12	69	81
Pgi-1	1	0,053	0,000	0,081	0,053
	2	0,316	0,188	0,306	0,266
	3	0,632	0,813	0,613	0,681
	n	19	16	31	47
Pgi-2	1	0,769	0,896	0,731	0,770
	2	0,231	0,104	0,269	0,230
	n	26	24	78	102
Prx-1	1	0,017	0,071	0,007	0,022
	2	0,466	0,357	0,426	0,410
	3	0,517	0,571	0,566	0,567
	n	29	21	68	89
Prx-2	1	0,200	0,400	0,494	0,473
	2	0,800	0,600	0,506	0,527
	n	30	25	86	111
Skdh	1	0,278	0,067	0,080	0,077
	2	0,667	0,800	0,681	0,702
	3	0,056	0,133	0,239	0,220
	n	18	15	69	84

Tabela 12. Heterozigosidades observadas (H_o), esperadas (H_e), porcentagem de locos polimórficos (P) e número de alelos por loco (A) em populações naturais de *M. villosum* em Mogi Guaçu (SP), baseados em 10 locos enzimáticos. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

		POPULAÇÃO “MN”		POPULAÇÃO “MA”	
Loco		Adultos	Adultos	Jovens	Ad + Jovens
α -Est	H_o	0,083	0,087	0,200	0,173
	H_e	0,494	0,294	0,502	0,467
Mdh-1	H_o	0,296	0,167	0,118	0,128
	H_e	0,252	0,153	0,131	0,136
Mdh-2	H_o	0,037	0,091	0,094	0,093
	H_e	0,036	0,087	0,090	0,089
Mdh-3	H_o	0,000	0,125	0,065	0,075
	H_e	0,000	0,117	0,088	0,093
6Pgdh	H_o	0,444	0,833	0,580	0,617
	H_e	0,475	0,517	0,583	0,574
Pgi-1	H_o	0,421	0,250	0,226	0,234
	H_e	0,499	0,305	0,524	0,463
Pgi-2	H_o	0,462	0,208	0,538	0,461
	H_e	0,355	0,187	0,393	0,355
Prx-1	H_o	0,586	0,429	0,809	0,719
	H_e	0,515	0,541	0,498	0,509
Prx-2	H_o	0,200	0,240	0,337	0,315
	H_e	0,320	0,480	0,500	0,499
Skdh	H_o	0,111	0,400	0,609	0,571
	H_e	0,475	0,338	0,472	0,452
Média	H_o	0,264 (0,065)	0,283 (0,071)	0,358 (0,082)	0,339 (0,075)
	* H_o	0,284 (0,069)	0,305 (0,076)	0,376 (0,090)	0,357 (0,081)
	H_e	0,342 (0,061)	0,302 (0,053)	0,378 (0,062)	0,364 (0,059)
	* H_e	0,325 (0,065)	0,303 (0,059)	0,365 (0,068)	0,352 (0,065)
	P	90,00	100,00	100,00	100,00
	*P	88,89	100,00	100,00	100,00
	A	2,40 (0,22)	2,40 (0,16)	2,70 (0,21)	2,70 (0,21)
	*A	2,33 (0,24)	2,33 (0,17)	2,67 (0,24)	2,67 (0,24)

-Números entre parênteses representam o desvio padrão.

*Média calculada com a exclusão do loco α -Est.

normal considerando as propriedades dessas estatísticas que são muito dependentes do tamanho amostral, como já foi revisto.

O padrão de redução no número médio de alelos por loco também foi observado em todas as categorias da população “MA”. Os adultos desta população tiveram reduzido este índice de 2,40 para 2,33 a exemplo do que ocorreu com os adultos da população “MN”, enquanto os jovens experimentaram uma redução de 2,70 para 2,67.

O mesmo não aconteceu com os índices de polimorfismo na população “MA”, que mantiveram-se em 100,00%, quando os resultados do loco α -Est foram excluídos da média.

A diversidade gênica (H_e) com a totalidade dos locos, variou de 0,302 para os adultos da população “MA” à 0,378 para os jovens desta população. Quando consideradas as populações de forma global, o valor de H_e foi 0,342 para a população “MN” e 0,364 para a população “MA”. Estes valores estão entre os mais altos das espécies arbóreas tropicais, mostrando que a espécie mostra-se adequada a um planejamento, visando sua conservação genética e manejo.

Os valores de heterozigosidade observados médios variaram de 0,264 para a população “MN” a 0,358 para os jovens da população “MA”, mostrando uma maior diversidade da população antropizada. Isto deve-se principalmente aos indivíduos jovens da população antrópica, pois quando se considera apenas os adultos a diversidade média desta população cai para 0,283, valor próximo ao dos adultos da população de modelo natural (MN).

Não há razão para se discutir os resultados das heterozigosidades observadas e esperadas com a exclusão do loco α -Est, visto que o interesse é determinar os valores de diversidade com a totalidade de locos amostrados. Entretanto, como será visto posteriormente, este loco influencia a estrutura das populações em todas as comparações realizadas, não concordando com os padrões dos demais locos.

Aliás, o efeito da exclusão sobre as heterozigosidades foi o de diminuir a diferença entre as proporções de heterozigotos observadas e esperadas. Isto foi notado em todas as situações de análise. Como exemplo, as heterozigosidades observada e esperada dos adultos da população “MA” sem a exclusão são respectivamente 0,283 e 0,302. Com a exclusão são 0,305 e 0,303, respectivamente.

Tendo alelos exclusivos, a maior heterozigosidade para os indivíduos jovens

é esperada. Entretanto, os maiores valores dos jovens em relação aos adultos não ocorrem em locos com maior número de alelos.

Em vez disso, há uma variação de loco para loco, ou seja, os jovens são mais heterozigóticos em alguns locos (α -Est, Prx-1, Prx-2 e Skdh) e não o são em outros. Esta variação, tanto pode ser efeito de deriva quanto de seleção, ou até mesmo a combinação de ambos, atuando sobre estes locos.

Os valores de heterozigosidade esperada apresentados na tabela 12, referem-se ao valor enviesado de Nei (1987), pelo motivo de ser este o valor utilizado no cálculo do excesso ou deficiência de heterozigotos ao nível de loco.

Aliás, as discrepâncias observadas na tabela 12 entre os valores observados e esperados das heterozigosidades, indicam que alguns locos não se ajustam aos pressupostos de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Nas tabelas 13 a 16 estão demonstrados os testes qui-quadrado e o de probabilidades exato de Fisher, verificando se as frequências genotípicas em cada loco de cada população e de cada categoria (adultos, jovens e adultos+jovens) ajustam-se ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências genotípicas observadas para o loco α -Est diferem estatisticamente das esperadas em todas as situações de análise nas duas populações. Na população de modelo natural (MN) além deste loco, o loco Skdh também não está em equilíbrio do teorema de Hardy-Weinberg.

Já na população “MA” quando se analisa apenas os indivíduos adultos, além da α -Est, têm-se os locos 6Pgdh e Prx-2 entre os dez locos enzimáticos que não estão em equilíbrio. Porém a situação mais discrepante ocorre entre os jovens desta população, em que dos dez locos analisados, seis (α -Est, Pgi-1, Pgi-2, Prx-1, Prx-2 e Skdh) estão em desacordo ao modelo de equilíbrio de HW.

Quando agrupa-se os indivíduos jovens aos adultos da população antropizada, cinco locos (α -Est, Pgi-1, Pgi-2, Prx-1, Prx-2 e Skdh) estão em desequilíbrio às pressuposições do teorema, o que leva a acreditar-se que grande parte deste efeito deve-se aos indivíduos jovens.

Os fatores que levam a uma distribuição de classes genotípicas observadas diferir das esperadas, são seleção, mutação, migração, deriva e cruzamentos não aleatórios (endogâmicos ou preferenciais).

Tabela 13. Teste qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher (P_{Fisher}) para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando números observados (n_o) e esperados (n_e) dos genótipos não agrupados (χ^2_{nagr}) ou agrupados (χ^2_{agr}) em três classes: 1.agrupamento dos homozigotos do alelo mais comum; 2.agrupamento dos heterozigotos entre os alelos mais comum e mais raro; 3.agrupamento dos homozigotos raros e outros heterozigotos, para os **adultos** da população “MN” de *Machaerium villosum* em Mogi Guaçu (SP). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

POPULAÇÃO “MN”						
ADULTOS DE <i>Machaerium villosum</i>						
Loco	Classe ou genótipo	n_o	n_e	χ^2_{nagr} P	χ^2_{agr} P	P_{Fisher}
α -Est	1	14	8,760		17,213	0,000**
	2	1	11,479		(1)	
	3	9	3,760		0,000**	
Mdh-1	11	0	0,593	0,084		1,000 ^{ns}
	12	8	6,815	(1)		
	22	19	19,593	0,772 ^{ns}		
Mdh-2	11	26	26,009	0,000		1,000 ^{ns}
	12	1	0,981	(1)		
	22	0	0,009	1,000 ^{ns}		
6Pgdh	1	8	8,000		0,000	1,000 ^{ns}
	2	8	8,000		(1)	
	3	2	2,000		1,000 ^{ns}	
Pgi-1	1	8	7,579		0,013	0,648 ^{ns}
	2	8	8,842		(1)	
	3	3	2,579		0,908 ^{ns}	
Pgi-2	11	14	15,385	1,174		0,282 ^{ns}
	12	12	9,231	(1)		
	22	0	1,385	0,279 ^{ns}		
Prx-1	1	7	7,759		0,090	0,719 ^{ns}
	2	16	14,483		(1)	
	3	6	6,759		0,764 ^{ns}	
Prx-2	11	3	1,200	2,497		0,060 ^{ns}
	12	6	9,600	(1)		
	22	21	19,200	0,114 ^{ns}		
Skdh	1	11	8,000		7,688	0,002**
	2	2	8,000		(1)	
	3	5	2,000		0,006**	

*P<0,05; **P<0,01. Número entre parênteses indica os graus de liberdade do teste. P = probabilidade.

Tabela 14. Teste qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher (P_{Fisher}) para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando números observados (n_o) e esperados (n_e) dos genótipos não agrupados (χ^2_{nagr}) ou agrupados (χ^2_{agr}) em três classes: 1. agrupamento dos homozigotos do alelo mais comum; 2. agrupamento dos heterozigotos entre os alelos mais comum e mais raro; 3. agrupamento dos homozigotos raros e outros heterozigotos, para os **adultos** da população “MA” de *Machaerium villosum*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

POPULAÇÃO “MA”						
ADULTOS DE <i>Machaerium villosum</i>						
Loco	Classe ou genótipo	n_o	n_e	χ^2_{nagr} P	χ^2_{agr} P	P_{Fisher}
α -Est	1	18	15,696		7,442	0,005**
	2	2	6,609		(1)	
	3	3	0,696		0,006**	
Mdh-1	11	0	0,167	0,000		1,000 ^{ns}
	12	4	3,667	(1)		
	22	20	20,167	1,000 ^{ns}		
Mdh-2	11	20	20,045	0,000		1,000 ^{ns}
	12	2	1,909	(1)		
	22	0	0,045	1,000 ^{ns}		
Mdh-3	11	0	0,063	0,000		1,000 ^{ns}
	12	2	1,875	(1)		
	22	14	14,063	1,000 ^{ns}		
6Pgdh	1	2	4,083		4,122	0,063 ^{ns}
	2	10	5,833		(1)	
	3	0	2,083		0,042*	
Pgi-1	22	1	0,563	0,029		0,434 ^{ns}
	23	4	4,875	(1)		
	33	11	10,563	0,865 ^{ns}		
Pgi-2	11	19	19,260	0,000		1,000 ^{ns}
	12	5	4,479	(1)		
	22	0	0,260	0,992 ^{ns}		
Prx-1	1	8	6,857		0,477	0,377 ^{ns}
	2	8	10,286		(1)	
	3	5	3,857		0,490 ^{ns}	
Prx-2	11	7	4,000	4,778		0,014*
	12	6	12,000	(1)		
	22	12	9,000	0,029*		
Skdh	1	9	9,600		0,120	1,000 ^{ns}
	2	6	4,800		(1)	
	3	0	0,600		0,729 ^{ns}	

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Número entre parênteses indica os graus de liberdade do teste. P = Probabilidade

Tabela 15. Teste qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher (P_{Fisher}) para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando números observados (n_o) e esperados (n_e) dos genótipos não agrupados (χ^2_{nagr}) ou agrupados (χ^2_{agr}) em três classes: 1.agrupamento dos homozigotos do alelo mais comum; 2.agrupamento dos heterozigotos entre os alelos mais comum e mais raro; 3.agrupamento dos homozigotos raros e outros heterozigotos, para os **jovens** da população “MA” de *Machaerium villosum* em Mogi Guaçu (SP). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

POPULAÇÃO “MA”						
JOVENS DE <i>Machaerium villosum</i>						
Loco	Classe ou genótipo	n_o	n_e	χ^2_{nagr} P	χ^2_{agr} P	P_{Fisher}
α -Est	1	40	28,830		27,958	0,000**
	2	13	35,340		(1)	
	3	22	10,830		0,000**	
Mdh-1	11	1	0,424	0,052		0,341 ^{ns}
	12	10	11,153	(1)		
	22	74	73,424	0,819 ^{ns}		
Mdh-2	11	77	77,188	0,000		1,000 ^{ns}
	12	8	7,624	(1)		
	22	0	0,188	1,000 ^{ns}		
Mdh-3	1	71	70,159		0,941	0,133 ^{ns}
	2	5	6,682		(1)	
	3	1	0,159		0,332 ^{ns}	
6Pgdh	1	17	18,264		0,187	0,634 ^{ns}
	2	37	34,471		(1)	
	3	15	16,264		0,665 ^{ns}	
Pgi-1	1	16	11,645		9,057	0,001**
	2	6	14,710		(1)	
	3	9	4,645		0,003**	
Pgi-2	11	36	41,654	9,141		0,001**
	12	42	30,692	(1)		
	22	0	5,654	0,002**		
Prx-1	1	11	21,978		26,473	0,000**
	2	55	33,404		(1)	
	3	2	12,798		0,000**	
Prx-2	11	28	21,003	8,164		0,003**
	12	29	42,994	(1)		
	22	29	22,003	0,004**		
Skdh	1	26	32,014		9,720	0,001**
	2	42	29,971		(1)	
	3	1	7,014		0,002**	

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Número entre parênteses indica os graus de liberdade do teste. P = probabilidade.

Tabela 16. Teste qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher (P_{Fisher}) para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando números observados (n_o) e esperados (n_e) dos genótipos não agrupados (χ^2_{nagr}) ou agrupados (χ^2_{agr}) em três classes: 1.agrupamento dos homozigotos do alelo mais comum; 2.agrupamento dos heterozigotos entre os alelos mais comum e mais raro; 3.agrupamento dos homozigotos raros e outros heterozigotos, para o **total** dos indivíduos **adultos e jovens** da população “MA” de *Machaerium villosum* em Mogi Guaçu (SP). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

POPULAÇÃO “MA”						
ADULTOS+JOVENS DE <i>Machaerium villosum</i>						
(TOTAL)						
Loco	Classe ou genótipo	n_o	n_e	χ^2_{nagr} P	χ^2_{agr} P	P_{Fisher}
α -Est	1	58	43,778		39,745	0,000**
	2	15	43,444		(1)	
	3	25	10,778		0,000**	
Mdh-1	11	1	0,587	0,007		0,447 ^{ns}
	12	14	14,826	(1)		
	22	94	93,587	0,933 ^{ns}		
Mdh-2	11	97	97,234	0,000		1,000 ^{ns}
	12	10	9,533	(1)		
	22	0	0,234	1,000 ^{ns}		
Mdh-3	1	85	84,218		0,499	0,184 ^{ns}
	2	7	8,565		(1)	
	3	1	0,218		0,480 ^{ns}	
6Pgdh	1	19	22,299		1,700	0,184 ^{ns}
	2	47	40,401		(1)	
	3	15	18,299		0,192 ^{ns}	
Pgi-1	1	27	21,787		10,482	0,001**
	2	10	20,426		(1)	
	3	10	4,787		0,001**	
Pgi-2	11	55	60,414	7,809		0,001**
	12	47	36,172	(1)		
	22	0	5,414	0,005**		
Prx-1	1	19	28,654		16,054	0,000**
	2	63	43,691		(1)	
	3	7	16,654		0,000**	
Prx-2	11	35	24,831	13,909		0,000**
	12	35	55,338	(1)		
	22	41	30,831	0,000**		
Skdh	1	35	41,440		9,959	0,001**
	2	48	35,119		(1)	
	3	1	7,440		0,002**	

*P<0,05; **P<0,01. Número entre parênteses indica os graus de liberdade do teste. P = probabilidade.

Considerando as populações de adultos de ambos os modelos verifica-se que as populações estão em equilíbrio sob panmixia para a maioria dos locos alozímicos (oito na população “MN” e sete na população “MA”). Como os efeitos de mutação são sempre considerados desprezíveis e também considerando a não tendência para o excesso de heterozigotos quanto para homozigotos, os desvios observados podem ser atribuídos majoritariamente à deriva genética, ou seja, aos efeitos de amostragem.

Porém, não é de todo descartada a hipótese de seleção em alguns locos, como por exemplo o α -Est, que será visto adiante. Se este for o caso, a pressuposição de neutralidade das enzimas não é plena. Aliás, em revisão feita por Torggler et al. (1995), algumas evidências do valor adaptativo das enzimas foram encontradas.

Não foi possível a aplicação do teste qui-quadrado para verificação da aderência dos dados ao equilíbrio de endogamia neutro de Wright nos locos que eventualmente apresentaram-se em desacordo às pressuposições de Hardy-Weinberg, posto que as frequências genóticas esperadas nas diversas classes não se ajustaram aos pressupostos do referido teste.

Os valores f de cada loco estão na tabela 17. Estes valores foram testados pelo qui-quadrado segundo Li & Horvitz (1953). O teste verifica se o valor de f é diferente de zero.

Os valores do f de endogamia para os adultos da população “MN” variaram entre pouco negativos, como o loco *Mdh-2* ($f = -0,019$) a altamente positivos como por exemplo o loco α -Est ($f = 0,831$). Na população “MA” de um modo geral, os valores maiores foram, em todas as categorias, demonstrados no loco α -Est e *Prx-2*. Tanto na categoria jovens como no total desta população, o loco *Pgi-1* também mostrou um valor de f alto (0,569 e 0,494, respectivamente).

Apesar destas variações, apenas os locos α -Est, *Prx-2* e *Skdh* tiveram seus valores f diferentes de zero, na população “MN”, mais uma vez evidenciando o equilíbrio desta população.

Na totalidade da população “MA”, seis locos (α -Est, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Prx-1*, *Prx-2* e *Skdh*) apresentaram um valor de f diferente de zero, porém não mostrando uma tendência clara, isto é, ora os locos apresentam excesso de heterozigotos, ora apresentam déficit deles. Quando considera-se apenas os jovens desta população, o mesmo padrão é encontrado. Sete locos (α -Est, *Mdh-3*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Prx-1*, *Prx-2* e

Tabela 17. Valores de f e teste qui-quadrado ao nível de loco para 10 locos enzimáticos em populações naturais de *M. villosum* em Mogi Guaçu (SP). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco		População “MN”		População “MA”	
		Adultos	Adultos	Jovens	Ad+Jovens
α -Est	$\hat{f}$	0,831	0,704	0,602	0,629
	χ^2	33,15(3)**	22,80(3)**	54,36(3)**	77,55(3)**
Mdh-1	$\hat{f}$	-0,174	-0,091	0,103	0,056
	χ^2	0,82(1) ^{ns}	0,20(1) ^{ns}	0,90(1) ^{ns}	0,34(1) ^{ns}
Mdh-2	$\hat{f}$	-0,019	-0,048	-0,049	-0,049
	χ^2	0,01(1) ^{ns}	0,05(1) ^{ns}	0,20(1) ^{ns}	0,26(1) ^{ns}
Mdh-3	$\hat{f}$	---	-0,067	0,259	0,193
	χ^2		0,07(1) ^{ns}	10,33(3)*	6,93(3) ^{ns}
6Pgdh	$\hat{f}$	0,065	-0,611	0,006	-0,075
	χ^2	0,15(3) ^{ns}	8,96(3)*	0,01(6) ^{ns}	1,37(6) ^{ns}
Pgi-1	$\hat{f}$	0,156	0,179	0,569	0,494
	χ^2	0,92(3) ^{ns}	0,51(1) ^{ns}	20,07(3)**	22,94(3)**
Pgi-2	$\hat{f}$	-0,300	-0,116	-0,368	-0,299
	χ^2	2,34(1) ^{ns}	0,32(1) ^{ns}	10,56(1)**	9,12(1)**
Prx-1	$\hat{f}$	-0,137	0,208	-0,626	-0,412
	χ^2	1,09(3) ^{ns}	1,82(3) ^{ns}	53,30(3)**	30,21(3)**
Prx-2	$\hat{f}$	0,375	0,500	0,325	0,368
	χ^2	4,22(1)*	6,25(1)*	9,08(1)**	15,03(1)**
Skdh	$\hat{f}$	0,766	-0,184	-0,288	-0,264
	χ^2	21,12(3)**	1,02(3) ^{ns}	11,45(3)**	11,71(3)**

*P<0,05 e **P<0,01. Número entre parênteses indicam os graus de liberdade (GL)

Skdh) tem valores f tanto positivos quanto negativos, estatisticamente diferentes de zero. Destes sete locos, três deles apresentaram um excesso de heterozigotos e os quatro restantes excesso de homozigotos. Ao contrário do que os trabalhos com espécies arbóreas dos ambientes tropicais têm mostrado, não há uma tendência clara de excesso de homozigotos para os jovens da população “MA”. Ressalta-se contudo, que a definição de jovens neste estudo é muito ampla, abrigando tanto plântulas como indivíduos já estabelecidos. Desta forma, a comparação com trabalhos correlatos fica prejudicada, pois os resultados apresentados nesses estudos referem-se basicamente à plântulas, as quais nessa fase apresentam excesso de homozigotos.

A situação na população “MA” tende a configurar-se ao senso comum, quando apenas os adultos são considerados. Apenas três locos (α -Est, 6Pgdh e Prx-2) têm um valor de f diferente de zero, havendo um pequeno excesso de heterozigotos, como já demonstrado em trabalhos similares. As variações verificadas, reforçam o efeito da deriva sobre as populações.

4.4. Estrutura genética

Os valores de F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} calculados para a caracterização da estrutura genética das populações estão demonstrados nas tabelas 18 a 21.

A comparação entre os totais das populações MN e MA (tabela 18) revela valores de F_{IS} e F_{IT} médios de 0,146 e 0,163 respectivamente, não diferentes de zero pelo teste z . Já o F_{ST} médio entre os locos destas populações atingiu 0,020 sendo significativo ($P < 0,01$). Ao nível de loco, quatro locos (α -Est, Pgi-2, Prx-1 e Prx-2) tiveram valores de F_{IS} diferentes de zero pelo teste qui-quadrado, enquanto o F_{IT} diferiu de zero em sete locos (α -Est, Mdh-3, Pgi-1, Pgi-2, Prx-1, Prx-2 e Skdh). Resultados totalmente inversos foram demonstrados pelos valores de F_{ST} em que apenas dois locos foram diferentes de zero (Prx-2 e Skdh). Embora contrastantes, isto é, enquanto a maior parte dos valores individuais de F_{IS} e F_{IT} difere de zero e suas médias não apresentam diferenças estatísticas, o F_{ST} , ao contrário, não difere de zero para a maioria de seus locos individuais, porém o faz para o valor médio.

Isto se explica justamente pela diferença entre os testes aplicados aos valores F . Enquanto os valores individuais são testados por seus valores intrínsecos pelo χ^2 ,

ao testar-se as médias pelo teste z , está verificando-se a heterogeneidade entre os locos. Posto que os valores de F_{IS} e F_{IT} atingem, na maioria das vezes, números superiores que o F_{ST} , a magnitude da diferença entre esses valores pode ser pequena, não refletindo em um desvio padrão alto.

No caso do F_{ST} , o inverso ocorre. Este índice raramente atinge valores altos - viu-se que na maioria das espécies ele situa-se na faixa de 0,03 - porém, a magnitude da heterogeneidade entre os locos, visto que tratam-se de valores muito pequenos, pode ser alta, refletindo num desvio padrão alto, que resultará em um intervalo pela curva normal padrão, significativo.

Aliás, o trabalho de Loiselle et al. (1995) que introduziu esse teste para a média dos F 's, revelou também este problema. Loiselle et al. (1995) demonstraram que os valores de F ao nível de loco não eram significativos para a maioria deles, ao passo que as médias eram. Com efeito, estes autores ainda utilizaram-se de um procedimento de reamostragem (*Jackknifing*) para obtenção do desvio padrão da média, o qual dá um valor menos enviesado deste desvio.

O valor do F_{ST} apurado na comparação entre as populações “MN” e “MA”, portanto, apesar de significativo pelas razões expostas, é muito baixo, da ordem de 2%. Mesmo quando se compara apenas os adultos destas populações, a divergência entre elas, ainda é muito baixa ($F_{ST} = 0,029$). As duas populações, portanto, são semelhantes geneticamente, comportando-se como uma única população. Aliás, a distância que separa estas populações, cerca de 2300 metros, não é suficiente para causar divergências significativas entre as populações. Sabe-se que populações de espécies arbóreas tropicais, que caracterizam-se por ter baixa densidade e grandes distâncias entre os indivíduos coespecíficos, têm mecanismos que permitem fluxo gênico e portanto causam a homogeneização das populações (O'Malley et al., 1988). Adicionalmente, a divergência entre os grupos não é função apenas da distância, mas também do tempo em que eles foram isolados. Em outras palavras, a fragmentação que ocorreu nas áreas utilizadas neste estudo não foi suficiente ainda para causar divergência basicamente, por restrição populacional.

Os valores médios de F_{IS} e F_{IT} para os adultos das populações “MN” e “MA” (tabela 19) foram 0,151 e 0,175, respectivamente. Tanto quando se compara as populações globalmente (adultos e jovens) como só por seus adultos, verifica-se índices de fixação médios próximos a 0,15, que são não significativos. Dado que nos

Tabela 18. Estrutura genética entre duas populações naturais (MN x MA_{TOTAL}) de *M.villosum* avaliada pela estatística F, em Mogi Guaçu (SP). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
α -Est	0,733**	0,734**	0,006 ^{ns}
Mdh-1	-0,094 ^{ns}	-0,078 ^{ns}	0,014 ^{ns}
Mdh-2	-0,040 ^{ns}	-0,034 ^{ns}	0,006 ^{ns}
Mdh-3	0,193 ^{ns}	0,208*	0,019 ^{ns}
6Pgdh	-0,012 ^{ns}	0,003 ^{ns}	0,015 ^{ns}
Pgi-1	0,319 ^{ns}	0,320**	0,003 ^{ns}
Pgi-2	-0,300*	-0,300**	0,000 ^{ns}
Prx-1	-0,274*	-0,270**	0,003 ^{ns}
Prx-2	0,370**	0,423**	0,083**
Skdh	0,264 ^{ns}	0,290**	0,036*
Média	0,146 ^{ns}	0,163 ^{ns}	0,020**
	(0,053) ^{ns}	(0,074) ^{ns}	(0,022)**

Os valores ao nível de locos foram testados pelo χ^2 e os valores médios pelo teste “z”. *P<0,05; **P<0,01.

Os valores entre parênteses representam a média calculada com exclusão do loco α -Est.

Tabela 19. Estrutura genética entre duas populações naturais (MN x MA_{ADULTOS}) de *M.villosum* avaliada pela estatística F, em Mogi Guaçu (SP). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
α-Est	0,784**	0,797**	0,059 ^{ns}
Mdh-1	-0,143 ^{ns}	-0,131 ^{ns}	0,010 ^{ns}
Mdh-2	-0,039 ^{ns}	-0,033 ^{ns}	0,006 ^{ns}
Mdh-3	-0,067 ^{ns}	-0,032 ^{ns}	0,032 ^{ns}
6Pgdh	-0,287 ^{ns}	-0,277 ^{ns}	0,008 ^{ns}
Pgi-1	0,165 ^{ns}	0,191 ^{ns}	0,031 ^{ns}
Pgi-2	-0,237 ^{ns}	-0,201 ^{ns}	0,029 ^{ns}
Prx-1	0,039 ^{ns}	0,047 ^{ns}	0,008 ^{ns}
Prx-2	0,450*	0,476**	0,048 ^{ns}
Skdh	0,371 ^{ns}	0,397*	0,040 ^{ns}
Média	0,151 ^{ns}	0,175 ^{ns}	0,029**
	(0,062) ^{ns}	(0,085) ^{ns}	(0,025)**

Os valores ao nível de locos foram testados pelo χ^2 e os valores médios pelo teste “z”. *P<0,05; **P<0,01.

Os valores entre parênteses representam a média calculada com exclusão do loco α-Est.

locos individuais, esses índices, principalmente o F_{IS} , são estatisticamente iguais a zero para a maioria dos locos envolvidos na análise, o único escape sistemático ocorre em grande magnitude para o loco α -Est. Este loco apresenta em todas as comparações valores positivos altamente significativos. Assim, é razoável supor que este loco esteja sofrendo efeitos de seleção no ambiente amostrado.

Tendo em vista que a divergência é muito pequena, que a maioria dos locos se comporta dentro do equilíbrio com valores dos F 's próximos a zero, evidenciando portanto, não haver desvios sistemáticos de cruzamentos entre aparentados, o nível médio de correlação entre os alelos medido pelos valores de F , demonstrados entre as populações, pode-se inferir que isto deve-se principalmente à inflação do loco α -Est, mais do que a endogamia devido a cruzamentos entre parentes ou ao possível sistema misto de reprodução.

Esta constatação fundamenta-se principalmente quando observa-se os valores de F_{IS} e F_{IT} médios calculados com a exclusão do loco α -Est. No caso da comparação entre as duas populações globalmente (Pop. MN_{total} x Pop. MA_{total}) (Tabela 18) o valor do F_{IS} reduz de 0,146 para 0,062 enquanto o do F_{IT} varia de 0,163 para 0,085. Os valores do F_{ST} mantêm-se igualmente baixos, porém com alguma redução.

Aliás, estas reduções eram esperadas considerando a queda das diferenças entre as heterozigosidades observadas e esperadas, calculadas com e sem o loco α -Est, como já visto.

Nas comparações dentro das categorias da população "MA", foram apurados valores de F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} entre jovens e adultos de 0,058, 0,075 e 0,018, e entre as reboleiras 2 e 12, de 0,074, 0,092 e 0,019, respectivamente (Tabelas 20 e 21).

Mais uma vez, verificou-se nessas análises o desvio sistemático do loco α -Est. Entretanto, quando exclui-se este loco, os valores dos F 's são quase nulos, tanto entre as categorias dentro da população "MA" quanto entre as reboleiras ($F_{IS} = -0,020$; $F_{IT} = -0,005$ na comparação jovens x adultos e $F_{IS} = 0,002$; $F_{IT} = 0,024$ na comparação reboleira 2 x reboleira 12).

A divergência entre adultos e jovens foi pequena, porém significativa. A pouca divergência entre adultos e jovens e também um valor baixo de correlação média nos grupos, medido pelos F 's, estão a demonstrar que a fragmentação não foi suficiente para afetar as futuras populações.

Tabela 20. Estrutura genética entre duas populações naturais (MA_{JOVENS} x MA_{ADULTOS}) de *M. villosum* avaliada pela estatística F, em Mogi Guaçu (SP). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
α-Est	0,640**	0,656**	0,045*
Mdh-1	-0,001 ^{ns}	-0,001 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Mdh-2	-0,049 ^{ns}	-0,049 ^{ns}	0,000 ^{ns}
Mdh-3	0,073 ^{ns}	0,081 ^{ns}	0,009 ^{ns}
6Pgdh	-0,284 ^{ns}	-0,279**	0,004 ^{ns}
Pgi-1	0,426**	0,446**	0,035 ^{ns}
Pgi-2	-0,287*	-0,230*	0,045*
Prx-1	-0,192 ^{ns}	-0,187 ^{ns}	0,004 ^{ns}
Prx-2	0,411**	0,416**	0,009 ^{ns}
Skdh	-0,245 ^{ns}	-0,226*	0,015 ^{ns}
Média	0,058 ^{ns}	0,075 ^{ns}	0,018**
	(-0,020) ^{ns}	(-0,005) ^{ns}	(0,015)**

Os valores ao nível de locos foram testados pelo χ^2 e os valores médios pelo teste “z”. *P<0,05; **P<0,01.

Os valores entre parênteses representam a média calculada com exclusão do loco α-Est.

Mais uma vez, não ficou evidente uma concentração de homozigotos na fase jovem, antes o contrário, havendo uma seleção em favor dos heterozigotos. Visto que as evidências apontam para um agrupamento da espécie e que na amostragem dos jovens agrupou-se todo indivíduo abaixo de 10 cm de diâmetro a altura do peito e portanto, indivíduos estabelecidos, pode ser que os indivíduos amostrados, os quais

Tabela 21. Estrutura genética entre duas reboleiras (MA₂ x MA₁₂) dentro de populações naturais de *M. villosum* avaliada pela estatística F, em Mogi Guaçu (SP). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
α-Est	0,562**	0,563**	0,003 ^{ns}
Mdh-1	-0,007 ^{ns}	-0,006 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Mdh-2	-0,208 ^{ns}	-0,115 ^{ns}	0,078**
Mdh-3	0,184 ^{ns}	0,203 ^{ns}	0,024 ^{ns}
6Pgdh	-0,139 ^{ns}	-0,107 ^{ns}	0,028 ^{ns}
Pgi-1	0,603**	0,606**	0,008 ^{ns}
Pgi-2	-0,306*	-0,250*	0,043*
Prx-1	-0,208 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	0,006 ^{ns}
Prx-2	0,283*	0,302**	0,026 ^{ns}
Skdh	-0,266 ^{ns}	-0,256*	0,008 ^{ns}
Média	0,074 ^{ns}	0,092 ^{ns}	0,019**
	(0,002) ^{ns}	(0,024) ^{ns}	(0,021)**

Os valores ao nível de locos foram testados pelo χ^2 e os valores médios pelo teste “z”. *P<0,05; **P<0,01.

Os valores entre parênteses representam a média calculada com exclusão do loco α-Est.

foram classificados como jovens, já foram selecionados, ficando apenas um “stand” de indivíduos que já compõe uma nova população.

Os valores de F médios em torno de 0,15 das populações globais ($MN_{total} \times MA_{total}$) com o loco α -Est incluído e de 0,07 quando ele é retirado do cálculo, indicam que está havendo seleção deste loco, embora isto seja de difícil comprovação pelos modelos utilizados pelo marcadores enzimáticos.

Um índice médio de fixação em torno de 0,07 como o apurado, não é desprezível, podendo ser atribuído ao sistema misto de reprodução, a cruzamentos preferenciais e endogâmicos, a seleção e efeitos de amostragem (deriva).

Considerando porém, o modelo agrupado de distribuição da espécie, a auto-incompatibilidade relatada em espécies da sub-família que engloba o *Machaerium villosum*, os baixos valores de fixação demonstrados nos jovens e reboleiras, o fator mais provável atuando sobre os adultos da população é a deriva.

Os valores de F_{ST} médios em torno de 2%, além de indicar uma baixa divergência entre os grupos ou populações, comportando-se as populações amostradas portanto, como uma única população, ainda tem o poder de indicar que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações, mostrando que a espécie tem um tamanho efetivo grande. Visto que o F_{ST} mede a correlação de união dos gametas no grupo em relação a população como um todo, e como demonstrado por Nei (1977) os valores de F podem ser calculados com base nas heterozigosidades observadas e esperadas, o F_{ST} tem o significado de demonstrar o quanto a diversidade total da população reduziu-se dentro das populações.

4.5. Taxa de cruzamento

Os valores estimados da taxa de fertilização cruzada, ao nível de loco e média entre os locos estão demonstrados na tabela 22.

Estes valores, obtidos a partir da relação $\hat{t} = 1 - \hat{f} / 1 + \hat{f}$, foram calculados com base no F_{IS} entre as populações MN e MA, considerando nesta última o total da população e apenas os indivíduos adultos.

Os valores de t para os adultos variaram de 0,121 para o loco α -Est a 1,805 para o loco 6Pgdh, com média geral de 0,738. Quando exclui-se o loco α -Est da média, a taxa de cruzamento da população adulta vai a 0,883.

Tabela 22. Taxa de fertilização cruzada obtida por meio das frequências dos heterozigotos para 10 locos enzimáticos em populações naturais de *Machaerium villosum* Vog., em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

t		
LOCO	ADULTOS	TOTAL
α -Est	0,121	0,154
Mdh-1	1,334	1,208
Mdh-2	1,081	1,083
Mdh-3	1,144	0,676
6Pgdh	1,805	1,024
Pgi-1	1,395	0,516
Pgi-2	1,621	1,857
Prx-1	0,925	1,755
Prx-2	0,379	0,460
Skdh	0,459	0,582
Média	0,738	0,745
	(0,883)	(0,899)

Os valores entre parênteses representam a média com a exclusão do loco α -Est.

As taxas de cruzamento calculadas para cada loco quando agrupa-se as categorias populacionais (adultos mais jovens) seguem o mesmo padrão dos adultos, variando de 0,154 para o loco α -Est a 1,857 para o loco Pgi-2.

O valor médio desta categoria foi 0,745, portanto, próximo ao valor obtido nos adultos. De forma igual, a taxa de fertilização cruzada média nesta categoria eleva-se a 0,899 quando exclui-se o loco α -Est.

Os valores superiores a um, obtidos segundo a relação proposta, sugerem um excesso de heterozigotos, enquanto o inverso pode significar tanto a existência de cruzamentos endogâmicos como a possibilidade de sistemas mistos de cruzamento.

Pela tabela 22, observa-se que sete locos nos adultos e cinco na totalidade das populações apresentam valores muito próximos ou superiores a um, indicando uma alta taxa de cruzamento.

Dado que, como foi revisto, espécies arbóreas papilionadas, como o *Machaerium villosum*, apresentam uma auto-incompatibilidade do tipo gametofítica homomórfica, é pouco provável que valores que se desviam abaixo de um sejam devidos ao sistema misto de cruzamento. Os cruzamentos endogâmicos e preferenciais podem estar ocorrendo em uma taxa pequena.

Igualmente notado por outras estatísticas neste estudo, o loco α -Est quanto a taxa de cruzamento é o que mais desvia-se da média, podendo estar indicando a seleção deste loco nos ambientes amostrados, o que causaria um excesso de homozigotos neste loco e consequentemente uma redução no valor da taxa de cruzamento, porém, a deriva com toda certeza é uma força aliada neste caso, não só para este loco como para os demais locos analisados.

4.6. Fluxo gênico

As estimativas de fluxo gênico medidos pelo N_m e N_b entre as duas populações, estão demonstradas nas tabelas 23 e 24. São também apresentados os resultados de área de vizinhança calculados em três densidades distintas: 1^o) dez indivíduos por hectare; 2^o) 0,09 indivíduo por hectare ou um indivíduo a cada onze hectares e 3^o) um indivíduo por hectare.

Convém ressaltar, visto a distância que separa as duas populações amostradas e a baixa divergência entre elas, concluindo serem uma única população, os resultados indicam o total de troca gênica. Abordagem semelhante foi adotada por Sebbenn (1997).

Nas estimativas de fluxo gênico entre a população MN e a totalidade da população MA (adultos + jovens), foi omitido o resultado do loco Pgi-2, visto a divergência ser nula ($F_{ST} = 0,000$).

Os dois grupos populacionais, tanto quando considerados apenas os adultos (Tabela 24) quanto jovens e adultos (Tabela 23), apresentam valores de N_m superiores a 1,00 na maioria dos locos amostrados, exceção ao loco Prx-2 quando totaliza-se as categorias. Os valores médios de N_m foram 3,06 para jovens e adultos e 2,09 apenas para os adultos.

Como revisto, valores iguais ou superiores a 1,00 por geração, são suficientes para prevenir a diferenciação significativa entre as populações. Aliás, a baixa divergência observada entre os grupos amostrados é um sinal de intensa troca gênica

entre os grupos, embora os valores sejam inferiores aos obtidos por Reis (1996) em palmitreiro, com valores de divergência similares.

Isto deve-se a diferentes métodos aplicados ao cálculo de Nm. No caso do palmitreiro, as estimativas de Nm não consideram o número de grupos ou populações, o qual foi aqui considerado.

Fica evidente portanto, que valores semelhantes de divergência produzem estimativas semelhantes, desde que os mesmos métodos sejam utilizados. Assim, comparações entre espécies não tem muito significado, a não ser demonstrar que algumas tem amplo fluxo de genes e outras não.

Considerando que os resultados das espécies arbóreas tropicais quanto a diferenciação populacional, são sempre baixos, é esperado um intenso fluxo gênico. Isto confirma-se para o Jacarandá-paulista.

O tamanho de vizinhança, indica as unidades panmíticas, ou seja, um número circunscrito de indivíduos em que ocorre panmixia, considerando-se um modelo de fluxo contínuo.

As estimativas médias obtidas foram 19,15 indivíduos para os jovens e adultos e 13,15 para os adultos. A estimativa de Nb é função de Nm, evidenciando-se uma vez mais, a importância da natureza dos métodos utilizados.

Os resultados obtidos indicam que as vizinhanças são de aproximadamente 19 indivíduos, considerando apenas os adultos. Em outras palavras, 19 indivíduos compõem os grupos parentais que trocam genes ao acaso. Segundo Reis (1996), um número inferior a esse implicaria em aumento da divergência entre as vizinhanças em decorrência do aumento dos níveis de endogamia internos, além de outros efeitos como a deriva.

A área de vizinhança corresponde ao próprio tamanho de vizinhança quando a densidade de indivíduos é igual a um. No caso considerado de densidade igual a dez indivíduos adultos por hectare, os valores médios estimados para A foram 1,92 ha e 1,31 ha para adultos mais jovens e apenas adultos, respectivamente.

Quando uma densidade de 0,09 indivíduos reprodutivos por hectare é considerada, visto ser essa a densidade apurada em uma das populações (adultos da população MA), a área de vizinhança média eleva-se a 213,80 ha e 146,10 ha, respectivamente, para as categorias totais e para os adultos. Esses números representam a área mínima necessária para conter um tamanho de vizinhança

adequado à população, sendo uma informação importante na definição de estratégias de manejo e conservação genética.

Tabela 23. Estimativas de fluxo gênico (N_m), tamanho de vizinhança (N_b) e área de vizinhança (A) para populações naturais de *Machaerium villosum* Vog, a partir do F_{ST} obtido entre as populações MN e MA_{TOTAL} . $A(1)$ = densidade igual a 10 indivíduos /ha, $A(2)$ = 0,09 ind/ha e $A(3)$ =1 ind/ha. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco	N_m	N_b	$A(1)$	$A(2)$	$A(3)$
α -Est	10,35	65,06	6,51	722,86	65,06
Mdh-1	4,40	27,66	2,77	307,30	27,66
Mdh-2	10,35	65,06	6,51	722,86	65,06
Mdh-3	3,23	20,28	2,03	225,29	20,28
6Pgdh	4,10	25,79	2,58	286,52	25,79
Pgi-1	20,77	130,51	13,05	1450,08	130,51
Prx-1	20,77	130,51	13,05	1450,08	130,51
Prx-2	0,69	4,34	0,43	48,21	4,34
Skdh	1,67	10,52	1,05	116,84	10,52
Média	3,06	19,24	1,92	213,80	19,24

Contudo, como ponderou Reis (1996), essa interpretação é de utilidade prática frágil, pois indica que todos os indivíduos reprodutivos existentes na área mínima são necessários para a manutenção da estrutura genética atual. Dessa forma, esse autor sugere que métodos que forneçam uma estimativa independente e direta da área de vizinhança sejam aplicados, incluindo estimativas que envolvam o fluxo de pólen e a dispersão de sementes. Dada a escassez desses dados relativos ao *Machaerium villosum*, isto constitui-se em uma importante área para pesquisas futuras.

A distribuição em agrupados da espécie, porém, não assemelha-se a um modelo de fluxo gênico contínuo. O modelo de ilhas, aparenta ser o padrão de fluxo

gênico dessa espécie.

Outro fator importante, é que dentro dos agrupados a densidade do Jacarandá paulista é alta. Assim, uma estratégia para conservação da espécie é a manutenção do maior número possível de agrupados, constituindo-se cada agrupado uma subpopulação.

Corroborando para isto ainda, a função do número de subpopulações para o valor do número de migrantes (N_m), sendo este tanto maior quanto for o número de subpopulações.

Tabela 24. Estimativas de fluxo gênico (N_m), tamanho de vizinhança (N_b) e área de vizinhança (A) para populações naturais de *Machaerium villosum* Vog, a partir do F_{ST} obtido entre as populações MN e MA_{ADULTOS}. $A(1)$ = densidade igual a 10 indivíduos /ha, $A(2)$ = 0,09 ind/ha e $A(3)$ =1 ind/Ha. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco	N_m	N_b	$A(1)$	$A(2)$	$A(3)$
α -Est	1,00	6,26	0,63	69,59	6,26
Mdh-1	6,19	38,88	3,89	431,97	38,88
Mdh-2	10,35	65,06	6,51	722,86	65,06
Mdh-3	1,89	11,88	1,19	131,99	11,88
6Pgdh	7,75	48,69	4,87	541,05	48,69
Pgi-1	1,95	12,28	1,23	136,39	12,28
Pgi-2	2,09	13,15	1,32	146,10	13,15
Prx-1	7,75	48,69	4,87	541,05	48,69
Prx-2	1,24	7,79	0,78	86,54	7,79
Skdh	1,50	9,42	0,94	104,72	9,42
Média	2,09	13,15	1,32	146,10	13,15

4.7. Autocorrelação espacial

Na tabela 25 estão os resultados dos coeficientes de autocorrelação espacial medidos pelo índice I de Moran para os alelos dos locos enzimáticos apurados nas populações MA e MN, por dois métodos: o da conexão de Gabriel e o do vizinho mais próximo.

Na população MA apenas dois (alelos 2 e 3 da Pgi-1) entre 15 alelos foram positivamente significativos pelo método da conexão de Gabriel. Para os mesmos locos e alelos desta população, não houve significância dos coeficientes de autocorrelação calculados pelo método do vizinho mais próximo.

O alelo 2 do loco Mdh-1 e os alelos 1 e 2 do loco Skdh demonstraram uma autocorrelação positiva significativa pelo método da conexão de Gabriel na população MN. Quanto ao método do vizinho mais próximo, apenas o alelo 3 do loco enzimático Prx-2 foi significativo positivamente, nesta população.

De um modo geral os índices I de Moran situaram-se próximos a zero para quase todos os locos analisados em ambos os métodos na população MA. Já na população MN houve uma variação dos índices, tornando-se ora pouco positivos, ora pouco negativos, porém, a maioria dos alelos não demonstrou autocorrelação espacial.

Os correlogramas dos índices I de Moran apurados nas classes de distância das populações MA e MN estão nas figuras 5 a 17 e Anexo 2.

Os correlogramas apresentam a variação do I-Moran para cada alelo em função da distância, nas populações e a média de todos os alelos.

Os resultados das classes de distância da reboleira 2, são apresentados apenas por sua média (Figura 18), pois os dados individuais dos alelos assemelharam-se aos da população MA.

Nas tabelas 26 a 28 são apresentados sumariamente a proporção de coeficientes significativos em cada classe de distância.

Em média 18,7% dos índices I-Moran apurados na população MA, 18,1% na população MN e 13,3% na reboleira 2 foram significativos, com valores observados diferentes dos esperados sob a aleatoriedade.

Na população MA houve uma proporção de 26,7% para a classe de distância 0-5 metros e de 13,3% para a classe 5-10 metros de índices I-Moran positivos

significativos, os quais indicam uma maior dependência entre os alelos próximos. A partir dos dez metros de distância, os coeficientes de autocorrelação oscilaram entre os positivos e negativos, sendo que após 2500 metros de distância, as autocorrelações tornaram-se todas negativas, isto é, os indivíduos próximos são independentes nesta faixa de distância.

Tabela 25. Coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) em pontos conectados pela Conexão de Gabriel (CG) e método do vizinho mais próximo (VMP) para os alelos dos locos enzimáticos de *Machaerium villosum* Vog. em duas populações naturais em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco	Alelo	POPULAÇÃO “MA”		POPULAÇÃO “MN”	
		I _{CG}	I _{VMP}	I _{CG}	I _{VMP}
α -Est	2	0,139	0,107	0,000	0,089
	3	0,109	0,075	-0,024	0,093
Mdh-1	2	0,103	0,191	0,284*	0,273
Mdh-2	1	0,078	0,041	-0,041	-0,019
Mdh-3	2	0,026	-0,089	----	----
6Pgdh	2	0,007	-0,044	-0,020	-0,154
	3	-0,103	-0,231	0,175	0,093
Pgi-1	2	0,317**	0,232	-0,225	0,193
	3	0,317**	0,123	-0,314	0,047
Pgi-2	1	0,088	0,060	0,056	-0,071
Prx-1	2	0,049	0,041	-0,163	-0,380
	3	0,076	0,088	-0,201	-0,452
Prx-2	2	0,026	0,016	0,240	0,500*
Skdh	1	----	----	0,408*	0,311
	2	-0,087	-0,024	0,500**	0,229
	3	0,078	0,067		
Nº médio de conexões		131 $\pm$ 15	62 $\pm$ 7	33 $\pm$ 4	17 $\pm$ 1
Distância média (m)		41,35 $\pm$ 4,27	16,96 $\pm$ 2,66	35,00 $\pm$ 1,97	29,07 $\pm$ 2,70

*P<0,05; P<0,01. Os intervalos de confiança das médias foram calculados com 95% de probabilidade.

Tabela 26. Porcentagem dos índices I de Moran significativos em cada classe de distância para os alelos dos locos enzimáticos da população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999. %Sig = proporção de índices I significativos dentro da classe; % Sig+ e % Sig- = proporção positiva e negativa da significância na classe.

CLASSE (m)	% Sig	% Sig+	% Sig-
0-5	26,7	100	0
5-10	13,3	100	0
10-20	26,7	25	75
20-30	33,3	60	40
30-50	6,7	100	0
50-150	33,3	0	100
150-1000	6,7	100	0
1000-2500	26,7	50	50
2500-3000	13,3	0	100
3000-3200	13,3	0	100
Média	18,7	50	50

Tabela 27. Porcentagem dos índices I de Moran significativos em cada classe de distância para os alelos dos locos enzimáticos da população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999. %Sig = proporção de índices I significativos dentro da classe; % Sig+ e % Sig- = proporção positiva e negativa da significância na classe.

CLASSE (m)	% Sig	% Sig+	% Sig-
0-50	28,6	100	0
50-80	21,4	0	100
80-120	0,0	0	0
120-335	17,8	40	60
Média	18,1	50	50

Tabela 28. Porcentagem dos índices I de Moran significativos em cada classe de distância para os alelos dos locos enzimáticos da reboleira 2 da população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999. % Sig = proporção de índices I significativos dentro da classe, % Sig+ e % Sig- = proporção positiva e negativa da significância na classe.

CLASSE (m)	% Sig	% Sig+	% Sig-
0-5	20,0	100	0
5-10	6,7	100	0
10-15	13,3	0	100
15-20	6,7	0	100
20-25	0,0	0	100
25-30	26,7	25	75
30-35	20,0	100	0
35-50	20,0	67	33
50-120	0,0	0	100
120-190	20,0	0	100
Média	13,3	50	50

Figura 5. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos 2 e 3 do loco enzimático α -Est, em dez classes de distância, na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 6. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos Mdh-1, Mdh-2 e Mdh-3, em dez classes de distância, na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 7. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos 2 e 3 do loco enzimático 6Pgdh, em dez classes de distância, na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 8. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos Pgi-1 e Pgi-2, em dez classes de distância, na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 9. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos Prx-1 e Prx-2, em dez classes de distância, na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 10. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos 2 e 3 do loco enzimático Skdh, em dez classes de distância, na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 11. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para a média de 15 alelos de 10 locos enzimáticos, em dez classes de distância, na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 12. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos 2 e 3 do loco enzimático α -Est, em cinco classes de distância, na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 13. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos Mdh-1 e Mdh-2, em cinco classes de distância, na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 14. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos Pgi-1 e Pgi-2, em cinco classes de distância, na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 15. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos Prx-1 e Prx-2, em cinco classes de distância, na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 16. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) dos alelos dos locos enzimáticos 6Pgdh e Skdh, em quatro classes de distância, na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 17. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para a média de 14 alelos de 9 locos enzimáticos, em cinco classes de distância, da população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Figura 18. Correlograma dos coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para a média de 15 alelos de 10 locos enzimáticos, em 10 classes de distância, da reboleira 2 da População MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Na faixa de até 50 metros de distância na população MN houve uma proporção de 28,6% dos índices I-Moran positivos. Nas classes superiores esta proporção mantém-se na média de 20% (21,4% na faixa de 50-80 metros e 17,85% na faixa de 120-335 metros) porém, com as significâncias tendo predominância negativa. Ainda, na classe de distância entre 80-120 metros, nenhum caso de autocorrelação significativa foi constatado.

A reboleira 2 da população MA apresentou resultados de significância dos índices de autocorrelação espacial semelhantes aos da população a que pertence, ou seja, uma pequena porção de significância positiva até os dez metros.

A falta de autocorrelação espacial em classes de distância maiores, a maior parte dos coeficientes de autocorrelação não significativa nas classes menores e entre os índices I-Moran significativos, a existência de uma variação entre significância positiva (genótipos próximos similares ou dependentes) e negativa (genótipos próximos não similares ou independentes), estão a demonstrar que os alelos das populações analisadas distribuem-se aleatoriamente entre os indivíduos dentro das populações.

De forma igual, os indivíduos da reboleira 2 da população MA distribuem ao acaso, não confirmando a suspeita de estruturação dentro da reboleira.

Mais evidente fica a falta de estruturação espacial quando observa-se os correlogramas alélicos. Todos, inclusive as médias populacionais, apresentam uma distribuição do I-Moran muito próxima a zero demonstrando a disposição ao acaso dos genótipos.

A detecção de significância nos coeficientes de autocorrelação, mesmo quando muito baixos, é função do grande número de conexões empregadas nas classes, quase sempre superior a uma centena de conexões, neste trabalho. Isto possibilita uma melhor estimativa de I, contribuindo para diminuir o erro padrão. Desta forma, com uma amplitude de variação menor, pequenas diferenças são detectadas pelo teste de significância.

À luz dessa questão, Leonardi & Menozzi (1996) afirmam que correlogramas alélicos necessitam de um tamanho amostral grande para detectar estruturas espaciais significantes.

O fato dos alelos de alguns locos nas populações analisadas terem demonstrado estrutura espacial significativa pela conexão de Gabriel e pelo método do vizinho mais próximo, não invalida a conclusão pela falta de estruturação. No caso da população MA, apenas 2/15 dos alelos apresentaram significância no coeficiente de autocorrelação, proporção próxima as apuradas nas classes de distância.

Na população MN, 3/14 dos alelos analisados pela conexão de Gabriel e 1/14 no vizinho mais próximo apresentaram uma autocorrelação positiva. Além de próximos aos resultados dos correlogramas, ainda muito baixos, reforçando a não formação de estrutura espacial da população.

Diferente do que preceitua a literatura, o método do vizinho mais próximo não detectou uma maior estruturação do que outros métodos como seria esperado. Isto denota uma provável falta de correlação entre os indivíduos próximos.

Considerando a fragmentação das populações, a principal força evolutiva que pode estar agindo em alguns alelos de determinados locos causando estrutura é a deriva, conforme preconizam Sokal & Menozzi (1982).

Os resultados desta espécie estão em acordo com os apresentados por outras espécies arbóreas tropicais, além de ser concordante com a alta taxa de cruzamento da espécie e o intensivo fluxo gênico verificado, os quais são fatores que previnem a formação de estrutura, evitando divergências locais da frequência gênica.

Ainda, os resultados da análise de autocorrelação modelam-se as outras estimativas apuradas neste trabalho, como por exemplo as estatísticas F. Conforme verificou-se nessas estatísticas, as populações apresentam baixa divergência e um coeficiente de endogamia médio dentro das populações de 0,15, causado principalmente por deriva.

5. CONCLUSÕES

A espécie *Machaerium villosum* apresentou neste estudo uma alta variação genética, superior a média das espécies arbóreas tropicais. A forma como foi conduzida a amostragem evidencia que a distribuição espacial da espécie é agrupada, porém a espécie pode ser classificada como rara na escala global.

Verificou-se que a maior parte da variabilidade está mantida dentro das populações da espécie.

A divergência entre as populações é baixa, indicando que as populações constituem um só grupo e que a fragmentação havida no ambiente não foi suficiente para causar problemas genéticos pela restrição do tamanho populacional.

A correlação entre as populações foi em torno de 0,15, sobretudo devido a provável seleção atuando sobre o loco α -Est e a deriva genética.

A taxa de fecundação cruzada obtida a partir da frequência dos heterozigotos situa-se na média de 0,89, não considerando o loco α -Est por haver indícios de seleção neste loco que afetam a estimativa.

Houve um intenso fluxo gênico entre as populações e não foi detectada a estruturação espacial entre genótipos dentro das populações. Isto de certa forma está em acordo com a alta taxa de fecundação cruzada da espécie.

A alta diversidade desta espécie a torna apta a aplicação de programas de conservação genética. Por sinal, visto que as populações estudadas apresentam-se “saúdáveis” do ponto de vista genético e que as áreas amostradas são unidades de conservação com objetivos específicos de preservação ambiental, a população desta espécie, pode-se constituir um banco de germoplasma, em que pode-se lançar mão em programas de recuperação ambiental.

Por ser uma espécie rara que está mostrando-se razoavelmente adaptada a um ambiente fragmentado, pode ser um indicativo do grau de preservação dos fragmentos estudados.

BIBLIOGRAFIA

- ALFENAS, S.A. et al. **Eletroforese de Proteínas e Fungos e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- ALLENDORF, F.W. Isolation, Gene Flow and Genetic Differentiation among Populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Eds.) **Genetics and Conservation: a reference for managing animal and plant populations**. Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings, 1983. p. 51-65.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; GARCIA-BARRIOS, R.; LARA-MORENO, C.; MARTÍNEZ-RAMOS, M. Demographic and Genetic models in Conservation biology: Applications and perspectives for Tropical Rain Forest Tree Species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.27, p.387-421, 1996.
- ANDRADE, E.N.; VECCHI, O. **Le Bois Indigènes de São Paulo**. São Paulo. 1916. 376 p.
- ARROYO, M.T.K. Breeding systems and Pollination Biology in Leguminosa. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. **Advances in Legume Systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p.723-769.
- BARRET, S.C.H.; KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Eds.). **Genetics and Conservation of Rare Plants**. New York: Oxford Univ. Press, 1991. p. 3-30.
- BATISTA, E.A. Levantamentos fitossociológicos aplicados à vegetação de cerrado, utilizando-se de fotografias aéreas verticais. Piracicaba, 1982. 86p. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BATISTA, E.A. Influência de fatores edáficos no cerrado da Reserva Biológica de Mogi Guaçu/SP. Piracicaba, 1988. 194p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- BATISTA, E.A.; COUTO, H.T.Z. Influência de fatores físicos do solo sobre o desenvolvimento das espécies florestais mais importantes do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, SP. **Revista do Instituto Florestal**, v.4 (parte 1-edição especial), p.318-323, 1992a.
- BATISTA, E.A.; COUTO, H.T.Z. Influência de fatores químicos do solo sobre o desenvolvimento das espécies florestais mais importantes do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, SP. **Revista do Instituto Florestal**, v.4 (parte 1-edição especial), p.324-9, 1992b.
- BAWA, K.S.; ASHTON, P.S. Conservation of Rare Trees in Tropical Rain Forests: A Genetic Perspective. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Eds.). **Genetics and Conservation of rare plants**. New York: Oxford Univ. Press, 1991. p.62-74.
- BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Can. J. For. Res.** v.27, n.3, p.415-424, 1997.
- BERTONI, J.E.A. et al. Nota prévia: Comparação fitossociológica das principais espécies de florestas de terra firme e ciliar na Reserva Estadual de Porto Ferreira (SP). **Silvicultura em São Paulo**, v.16A, parte 1(ed.especial), p.563-571, 1982.
- BREWBAKER, J.L. et al. Isoenzyme Polymorphism in Flowering Plantas. III. Gel Eletrophoretic Methods and Applications. **Physiologia Plantarum**, v.21, p.930-940, 1968.
- BROWN, A.H.D. Isozymes, Plant Population Genetic Structure and Genetic Conservation. **Theor.Appl.Genet.**, v.52, p.145-157, 1978.
- BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Eds.). **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**, Part A. Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 1983. p.219-239.
- BUDOWSKI, G. Distribution of tropical American rain forest species in the light of successional processes. **Turrialba**, v.15, n.1, p.40-42, 1965.

- BUDOWSKI, G. The distinction between old secondary and climax species in tropical central American lowland forests. **Trop. Ecol.**, v.11, n.1, p.44-48, 1970.
- CAVASSAN, O., CESAR, O.; MARTINS, F.R. Fitossociologia da vegetação arbórea da Reserva Estadual de Bauru, Estado de São Paulo. **Revta.brasil.Bot.**, v.7, n.2, p.91-106, 1984.
- CHAMBERLAIN, J. R. Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae): its implication for species delimitation and conservation. **American Journal of Botany**, v.85, n.1, p.37-47, 1998.
- CLAYTON, J.; TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, v.29, p.1169-1172. 1972.
- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, p.72-84, 1969.
- COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Correlations, descent measures: Drift with migration and mutation. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.**, v.84, p.8512-8514, 1987.
- COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, v.47, n. 3, p.855-863. 1993.
- CROW, J.F.; AOKI, K. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.**, v.81, p.6073-6077, 1984.
- CROW, J.F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. New York: Harper & Row Publishers, 1970. 591p.
- DEPRN. **Projeto Olho Verde**. São Paulo: Departamento de Proteção aos Recursos Naturais do Estado de São Paulo, 1991.
- DEWEY, S.E.; HEYWOOD, J.S. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. 1. Distribution os genotypes. **Evolution**, v.42, n.4, p.834-

838, 1988.

DOLIGEZ, A.; JOLY, H.I. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. **Heredity**, v.79, p.72-82, 1997.

EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, N.; PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, v.69, p.217-228, 1992.

EITEN, G. Habitat flora of Fazenda Campininha, São Paulo, Brazil. In: FERRI, M.G. (Coord.). **Simpósio sobre o cerrado**. São Paulo: Edgard Blucher e EDUSP, 1963. p.157-202.

ELLSTRAND, N.C.; ELAM, D.R. Population genetic consequences of small populations size: Implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.24, p.217-242, 1993.

EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Massachusetts: Sinauer Associates. 1989. p.229-253.

EPPERSON, B.K. Spatial distributions os genotypes under isolation by distance. **Genetics**, v.140, p.1431-1440. 1995.

EPPERSON, B.K.; ALLARD, R.W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of Lodgepole Pine. **Genetics**, v.121, p.269-377. 1989.

FELFILI, J.M. Floristic composition and phytosociology of the gallery forest alongside the Gama stream in Brasília, DF, Brazil. **Revta.brasil.Bot.**, v.17, n.1, p.1-11, 1994.

FERRETI, A.R. et al. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, v.3,

n.7, p.73-77, 1995.

FRANKEL, O.H. The place of management in conservation. In: SCHONEWALD-COX, C.M., CHAMBERS, S.M., MACBRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Eds.). **Genetics and Conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Pub.Company, 1983. p. 1-14.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annu. Rev. Genet.**, v.29, p. 305-27, 1995.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646p.

GANDARA, F.B. Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae). Campinas, 1995. 69p. Dissertação (M.S.) - Universidade Estadual de Campinas.

GIBBS, P. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revta.brasil.Bot.**, v.13, n.2, p.125-136, 1990.

GIBBS, P.E.; LEITÃO FILHO, H.F. Floristic composition of an area of gallery forest near Mogi Guaçu, state of São Paulo, SE. Brazil. **Revta.brasil.Bot.**, v.1, n.2, p.151-156, 1978.

GIBBS, P.E., LEITÃO FILHO, H.F.; ABBOTT, R.J. Application of the point-centred quarter method in a floristic survey of an area of gallery forest at Mogi Guaçu, SP, Brazil. **Revta.brasil.Bot.**, v.3, n.1/2, p.17-22, 1980.

GOMES, F.P. **Iniciação à Estatística**. 5.ed. São Paulo: Nobel, 1976. 233p.

GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. 13.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 468p.

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K. Effect of Forest Fragmentation on Genetic Diversity and Mating System in a Tropical Tree, *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, v.10, n.3, p.757-768, 1996.

- HAMRICK, J.L. The Distribution of Genetic Variation within and among Natural Plant Populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M., CHAMBERS, S.M., MACBRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Eds.). **Genetics and Conservation: a reference for managing wild animal and plant populations.** Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Pub. Company, 1983. p.335-348.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.D.H.; CLEG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources.** Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1990. p. 43-63.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon Neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, v.7, p.395-399, 1991.
- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.10, p.173-200, 1979.
- HEDRICK, P.W.; MILLER, P.S. Conservation genetics: techniques and fundamentals. **Ecol. Appl.**, v.2, p.30-46, 1992.
- HEYWOOD, J.S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.22, p.335-355. 1991.
- HOEHNE, F.C. **Flora Brasílica.** São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio, 1941. 107p.
- HUBBEL, S.P.; FOSTER, R.B. Commonness and rarity in a neotropical forest: implications for tropical tree conservation. In: SOULÉ, M.E. (Ed.). **Conservation Biology: Science of scarcity and diversity.** Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, 1986. p. 205-231.
- JANZEN, D.H. The future of tropical biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.17, p.305-324, 1986.

- JOLY, A.B. **Botânica:** introdução à taxonomia vegetal. 5.ed. São Paulo: Ed.Nacional, 1979. 777p.
- JOLY, H.I.; ZEH-NLO, M.; DANTHU, P.; AYGALANT, C. Population Genetics of an African Acacia, *Acacia albida*. I. Genetic Diversity of Populations from West Africa. **Aust. J. Bot.**, v.40, p.59-73, 1992.
- KAGEYAMA, P.; GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, Águas de Lindóia, 1993. **Anais**. São Paulo: ACIESP, 1993. Vol. II, p. 1-9.
- KAGEYAMA, P.Y.; CASTRO, C.F.A.; CARPANEZZI, A.A. Implantação de matas ciliares: estratégias para auxiliar a sucessão secundária. In: SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR, São Paulo, 1989. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. p.130-143.
- KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, v.77, n.5, p.693-712, 1990.
- KITAMURA, K.; RAHMAN, M.Y.B.A. Genetic diversity among natural populations of *Agathis borneensis* (Araucariaceae), a tropical rain forest conifer from Brunei Darussalam, Borneo, Southeast Asia. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.1945-1949, 1992.
- LACERDA, C.M.B. Diversidade genética por isoenzimas em populações naturais de Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Freire, F. & M.F. Alemão) Anacardiaceae no semi-árido. Piracicaba, 1997. 96p. Dissertação (M.S) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v.241, p.1455-1460, 1988.
- LAURANCE, W.F.; BIERREGARD, R.; MORITZ, C.; VIANA, V.M. et al. Tropical forest remnants: synthesis of a dynamic and eclectic. In: BIERREGARD, R.;

- LAURANCE, W. (Eds.). **Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragment communities**. Chicago: Chicago University Press, 1997.
- LEGENDRE, P. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? **Ecology**, v.74, n.6, p.1659-1673. 1993.
- LEONARDI, S.; MENOZZI, P. Spatial structure of genetic variability in natural stands of *Fagus sylvatica* L. (beech) in Italy. **Heredity**, v.77, p.359-368. 1996.
- LEPSCH-CUNHA, N. Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia Central. Piracicaba, 1996. 147p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- LI, C.C.; HORVITZ, D.G. Some methods of estimating the Inbreeding Coefficient. **The American Journal of Human Genetics**, v.5, n.2, p.107-117, 1953.
- LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v.82, n.11, p.1420-1425, 1995.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, p.65-95, 1984.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. **Rev. Biol.Trop.**, v.35, Supl.1, p.165-175, 1987.
- MANTOVANI, W. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, Estado de São Paulo. Campinas, 1983. 147p. Dissertação (M.S.) - Instituto de Biologia, UNICAMP.
- MANTOVANI, W. et al. Estudo fitossociológico de áreas de mata ciliar em Moji-

- Guaçu, SP, Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR, São Paulo, 1989. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. p.235-267.
- MARTINS, F.R. O método de quadrantes e a fitossociologia de uma floresta residual do interior do Estado de São Paulo: Parque Estadual de Vassununga. São Paulo, 1979. 239p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “*in situ*”. **IPEF**, v.35, p.71-78, 1987.
- MORAES, M.L.T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão - Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr.Allemão) Engler). Piracicaba, 1992. 139p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MUONA, O. Population genetics in forest tree improvement. In: BROWN, A.D.H.; CLEG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1990. p.282-298.
- MURAWSKI, D.A.; BAWA, K.S. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **American Journal of Botany**, v.81, n.2, p.155-160, 1994.
- NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proc.Nat.Acad.Sci.USA**, v.70, n.12, p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Hum Genet.**, v.41, p.225-233, 1977.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia Univ. Press,

1987. 512p.

NOGUEIRA, J.C.B. **Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas**. São Paulo: Instituto Florestal, 1977. 77p. (Boletim técnico, 24).

OLIVEIRA FILHO, A.T., SCOLFORO, J.R.S.; MELO, J.M. Composição florística e estrutura comunitária de um remanescente de floresta semidecídua montana em Lavras, MG. **Revta.brasil.Bot.**, v.17, n.2, p.167-182, 1994.

OLIVEIRA FILHO, A.T. et al. Estrutura fitossociológica e variáveis ambientais em um trecho da mata ciliar do córrego dos Vilas Boas, Reserva Biológica do Poço Bonito, Lavras (MG). **Revta.brasil.Bot.**, v.17, n.1, p.67-85, 1994.

O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.929-932, 1988.

PAGANO, S.N., LEITÃO FILHO, H.F.; SHEPHERD, G.J. Estudo fitossociológico em mata mesófila semidecídua no município de Rio Claro (Estado de São Paulo). **Revta.brasil.Bot.**, v.10, p.49-61, 1987.

PAIVA, J.R. Variabilidade enzimática em populações naturais de Seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. A.DC.) Muell.Arg.). Piracicaba, 1992. 145 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCovsky, R.; CONTEL, P.B. Genetic of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. A.DC.) Muell.Arg.). 1. Genetic variation in natural populations. **Silvae Genetica**, v.43, n.5/6, p. 307-312, 1994.

PERRY, D.J.; KNOWLES, P. Spatial genetic structure within three sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) stands. **Heredity**, v.66, p.137-142. 1991.

PIMM, S.L.; JONES, H.L.; DIAMOND, J.M. On the risk of extinction. **American Naturalist**, v.132, p.757-785, 1988.

PINTO, M.M. Levantamento fitossociológico de Mata Residual situada no Campus

de Jaboticabal da UNESP. Jaboticabal, 1989. 114p. Dissertação (M.S.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

PINTO, M.M.; GIUDICE NETO, J.; BATISTA, E.A. et al. Vegetação nativa das unidades de conservação e produção de Mogi Guaçu. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, Curitiba, 1997. **Coletânea de Trabalhos**. São Paulo:SMA, 1997.

REIS, M.S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de Palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius). Piracicaba, 1996. 210p. Tese (Doutorado) -Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU, EDUSP, 1976. 207p + ilustr.

RODRIGUES, R.R. et al. Estudo florístico e fitossociológico em um gradiente altitudinal de mata estacional mesófila semidecídua, na Serra do Japi, Jundiá, SP. **Revta.brasil.Bot.**, v.12, p.71-84, 1989.

SALIS, S.M., TAMASHIRO, J.Y.; JOLY, C.A. Florística e fitossociologia do estrato arbóreo de um remanescente de mata ciliar do rio Jacaré-Pepira, Brotas, SP. **Revta.brasil.Bot.**, v.17, n.2, p.93-103, 1994.

SEBBENN, A.M. Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas. Piracicaba, 1997. 107 p. Dissertação (M.S.) -Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SHAPCOTT, A. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, v.74, p.28-38. 1995.

SLATKIN, M. Gene flow in Natural Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p.393-430, 1985.

- SLATKIN, M.; ARTER, H.E. Spatial autocorrelation methods in population genetics. **American Naturalist**, v.138, p.499-517. 1991.
- SLATKIN, M.; BARTON, N.H. A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v.43, p.1349-1368, 1989.
- SOKAL, R.R.; MENOZZI, P. Spatial autocorrelation of HLA frequencies in Europe support demic diffusion of early farmers. **American Naturalist**, v.119, p.1-17. 1982.
- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology. 1. Methodology. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.10, p.199-228. 1978.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 2.ed. San Francisco: W.H.Freeman and Company, 1981. 859p.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. **Isozymes in plant biology**. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1989. 268p.
- SOS Mata Atlântica; INPE. **Evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados do domínio da Mata Atlântica**. São Paulo: SOS Mata Atlântica e Instituto de Pesquisas Espaciais, 1993.
- SOUZA, L.M.F.I. Estrutura genética de populações de *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) - Brasil. Piracicaba, 1997. 76 p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. **BYOSIS-1**. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Illinois: Natural History Survey, 1989. 43p.
- STRUFFALDI-DE VUONO, Y., BARBOSA, L.M.; BATISTA, E.A. A Reserva Biológica de Mogi Guaçu. **Silvicultura em São Paulo**, V.16A, parte 1 (ed.especial), p.548-558, 1982.
- STRUFFALDI-DE VUONO, Y.; BATISTA, E.A.; FUNARI, F.L. Balanço hídrico na

- área da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, São Paulo - Brasil. **Hoehnea**, v.13, p.73-85, 1986.
- TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isoenzimas: Variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186p.
- TURNER, I.M. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. **Journal of Applied Ecology**, v.33, p.200-209, 1996.
- VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **IPEF**, v.35, p.79-84, 1987.
- VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. In: Congresso Latino Americano de Genética, 10^o, Rio de Janeiro, 1992. **Proceedings**. Rio de Janeiro, 1992. p.53-60.
- VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.3, p.349-351, 1994.
- VIANA, V.M.; TABANEZ, A.A.J. Biology and Conservation of Forest Fragments in the Brazilian Atlantic Moist Forest. In: SCHELHAS, J.; GREENBERG, R. (Eds.). **Forest Patches in Tropical Landscapes**. Washington, DC: Island Press, 1996. p.151-167.
- VIEIRA, M.G.L. et al. Composição Florística e Estrutura Fitossociológica da Vegetação Arbórea do Parque Estadual de Vaçununga, Santa Rita do Passa Quatro (SP). II-Gleba Capetinga Oeste. **Revista do Instituto Florestal**, v.1, n.1, p.135-159, 1989.
- WEEDEN, N.F. Evolution of Plant Isozymes. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Eds.). **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**, Part (A). Amsterdam:Elsevier Science Publishers, 1983. p.175-205.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: Method for Discrete Population Genetic Data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 445p.

- WORKMAN, P.L.; NISWANDER, J.D. Population studies on Southwestern Indian Tribes. II. Local Genetic Differentiation in the Papago. **American Journal of Human Genetics**, v.22, p.24-49, 1970.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian Populations Genetics. **Genetics**, v.16, p. 97-159, 1931.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, p.114-38, 1943.
- WRIGHT, S. Evolution and the genetics population. **Ann. Eugenics**, v.15, p.323-354, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420, 1965.
- YEEH, Y., KANG, S.S. & CHUNG, M.G. Evaluations of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.37, p.141-146, 1996.

APÊNDICE

ANEXO 1

Tabela 29. Frequências genotípicas para dez locos enzimáticos na população MA_{TOTAL} de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

LOCO	GENÓTIPOS									
	11	12	13	14	22	23	24	33	34	44
α -Est	2	2	2	0	21	13	0	58	0	0
Mdh-1	1	14	0	0	94	0	0	0	0	0
Mdh-2	97	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Mdh-3	0	4	0	0	85	3	0	1	0	0
6Pgdh	1	11	2	0	19	36	0	11	1	0
Pgi-1	1	1	2	0	8	8	0	27	0	0
Pgi-2	55	47	0	0	0	0	0	0	0	0
Prx-1	1	1	1	0	5	62	0	19	0	0
Prx-2	35	35	0	0	41	0	0	0	0	0
Skdh	0	13	0	0	35	35	0	1	0	0

Tabela 30. Frequências genotípicas para dez locos enzimáticos na população MA_{ADULTOS} de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

LOCO	GENÓTIPOS									
	11	12	13	14	22	23	24	33	34	44
α -Est	0	0	1	0	3	1	0	18	0	0
Mdh-1	0	4	0	0	20	0	0	0	0	0
Mdh-2	20	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Mdh-3	0	2	0	0	14	0	0	0	0	0
6Pgdh	0	1	0	0	2	9	0	0	0	0
Pgi-1	0	0	0	0	1	4	0	11	0	0
Pgi-2	19	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Prx-1	1	1	0	0	3	8	0	8	0	0
Prx-2	7	6	0	0	12	0	0	0	0	0
Skdh	0	2	0	0	9	4	0	0	0	0

Tabela 31. Frequências genotípicas para dez locos enzimáticos na população MA^{JOVENS} de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

LOCO	GENÓTIPOS									
	11	12	13	14	22	23	24	33	34	44
α -Est	2	2	1	0	18	12	0	40	0	0
Mdh-1	1	10	0	0	74	0	0	0	0	0
Mdh-2	77	8	0	0	0	0	0	0	0	0
Mdh-3	0	2	0	0	71	3	0	1	0	0
6Pgdh	1	10	2	0	17	27	0	11	1	0
Pgi-1	1	1	2	0	7	4	0	16	0	0
Pgi-2	36	42	0	0	0	0	0	0	0	0
Prx-1	0	0	1	0	2	54	0	11	0	0
Prx-2	28	29	29	0	0	0	0	0	0	0
Skdh	0	11	0	0	26	31	0	1	0	0

Tabela 32. Frequências genotípicas para dez locos enzimáticos na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

LOCO	GENÓTIPOS									
	11	12	13	14	22	23	24	33	34	44
α -Est	0	1	0	0	8	1	0	14	0	0
Mdh-1	0	6	0	0	21	0	0	0	0	0
Mdh-2	26	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Mdh-3	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0
6Pgdh	0	2	0	0	8	6	0	2	0	0
Pgi-1	0	0	2	0	3	6	0	8	0	0
Pgi-2	14	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Prx-1	0	1	0	0	5	16	0	7	0	0
Prx-2	3	6	0	0	21	0	0	0	0	0
Skdh	5	0	0	0	11	2	0	0	0	0

Tabela 33. Frequências genotípicas para dez locos enzimáticos na reboleira 2 da população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

LOCO	GENÓTIPOS									
	11	12	13	14	22	23	24	33	34	44
α -Est	2	2	2	0	16	9	0	42	0	0
Mdh-1	1	10	0	0	72	0	0	0	0	0
Mdh-2	79	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Mdh-3	0	4	0	0	64	3	0	1	0	0
6Pgdh	0	9	1	0	18	28	0	10	1	0
Pgi-1	0	1	2	0	7	6	0	20	0	0
Pgi-2	33	43	0	0	0	0	0	0	0	0
Prx-1	0	0	1	0	1	54	0	11	0	0
Prx-2	26	27	0	0	32	0	0	0	0	0
Skdh	0	12	0	0	25	30	0	1	0	0

Tabela 34. Frequências genotípicas para dez locos enzimáticos na reboleira 12 da população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

LOCO	GENÓTIPOS									
	11	12	13	14	22	23	24	33	34	44
α -Est	0	0	0	0	4	4	0	9	0	0
Mdh-1	0	3	0	0	14	0	0	0	0	0
Mdh-2	10	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Mdh-3	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0
6Pgdh	1	2	1	0	0	5	0	1	0	0
Pgi-1	1	0	0	0	1	1	0	4	0	0
Pgi-2	13	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Prx-1	1	1	0	0	2	6	0	5	0	0
Prx-2	7	6	0	0	3	0	0	0	0	0
Skdh	0	1	0	0	6	4	0	0	0	0

ANEXO 2

Tabela 35. Classes de distâncias e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos α -Est, Mdh-1, Mdh-2 e Mdh-3 na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

L O C O									
Classe (m)	α -Est			Mdh-1		Mdh-2		Mdh-3	
	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)	Alelo 2	C (n ⁰)	Alelo 1	C (n ⁰)	Alelo 2	C (n ⁰)
0-5	0,073	0,070	244	0,010	314	0,007	310	0,027	255
5-10	-0,047	-0,028	423	0,003	538	0,090**	532	-0,029	415
10-20	-0,051*	-0,051*	1006	-0,026	1286	0,069**	1283	-0,017	1072
20-30	0,051*	0,019	558	-0,013	818	0,040*	813	0,006	588
30-50	-0,059	-0,018	266	-0,028	422	0,053	422	0,017	261
50-150	-0,014	-0,024	318	-0,003	351	-0,173**	268	-0,008	237
150-1000	-0,008	0,000	191	-0,011	157	-0,070	152	0,046	44
1000-2500	0,012	-0,009	225	-0,003	258	0,052*	255	-0,022	148
2500-3000	-0,021	-0,022	625	-0,004	773	-0,125**	720	-0,056	532
3000-3200	0,011	0,019	800	0,004	861	-0,139**	810	0,003	726

C = Número de conexões; *P<0,05; **P<0,01

Tabela 38. Classes de distâncias e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos α -Est, Mdh-1 e Mdh-2 na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

L O C O							
Classe (m)	α -Est		C (n ⁰)	Mdh-1		Mdh-2	
	Alelo 2	Alelo 3		Alelo 2	C (n ⁰)	Alelo 1	C (n ⁰)
0-50	-0,018	0,014	58	0,178*	73	-0,104	73
50-80	-0,136	-0,185	49	-0,228*	69	-0,022	69
80-120	-0,077	-0,055	70	-0,095	83	-0,074	83
120-170	-0,056	-0,085	43	0,386**	61	0,021	61
170-335	0,063	0,067	56	-0,407**	65	0,007	65

C = Número de conexões; *P<0,05; **P<0,01

Tabela 39. Classes de distâncias e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos Pgi-1, Pgi-2, Prx-1 e Prx-2 na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

L O C O										
Classe (m)	Pgi-1			Pgi-2		Prx-1			Prx-2	
	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)	Alelo 1	C (n ⁰)	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)	Alelo 2	C (n ⁰)
0-50	-0,072	-0,188	30	0,135*	72	-0,075	-0,083	90	0,134*	99
50-80	-0,024	-0,039	36	-0,366**	63	0,034	0,064	85	0,056	93
80-120	-0,144	0,005	38	-0,172	77	0,022	-0,024	90	-0,161	97
120-170	0,080	-0,034	31	0,486**	50	-0,205	-0,158	70	-0,110	73
170-335	-0,096	-0,045	36	-0,170	63	0,024	0,010	71	-0,134	73

C = Número de conexões; *P<0,05; **P<0,01

Tabela 40. Classes de distâncias e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos 6Pgdh e Skdh na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

L O C O						
Classe (m)	6Pgdh			Skdh		
	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)	Alelo 1	Alelo 2	C (n ⁰)
0-50	0,085	0,161	41	0,265*	0,129	30
50-80	-0,047	0,016	48	-0,319*	-0,239	37
80-120	0,075	0,050	30	-0,122	0,007	41
120-335	-0,368**	-0,526**	34	-0,003	-0,095	45

C = Número de conexões; *P<0,05; **P<0,01

Tabela 41. Classes de distância e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para a média de 15 alelos de 10 locos enzimáticos na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

CLASSES DE DISTÂNCIA (m)										
	0-5	5-10	10-20	20-30	30-50	50-150	150-1000	1000-2500	2500-3000	3000-3200
I-Moran	0,053	0,012	-0,030	-0,004	0,023	-0,059	0,025	-0,017	-0,033	-0,014

Tabela 42. Classes de distância e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para a média de 14 alelos de 9 locos enzimáticos na população MN de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

CLASSES DE DISTÂNCIA (m)					
	0-50	50-80	80-120	120-170	170-335
I-Moran	0,040	-0,103	-0,054	0,048	-0,068

Tabela 43. Classes de distâncias e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos α -Est, Mdh-1, Mdh-2 e Mdh-3 na reboleira 2 da população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

L O C O									
Classe (m)	α -Est			Mdh-1		Mdh-2		Mdh-3	
	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)	Alelo 2	C (n ⁰)	Alelo 1	C (n ⁰)	Alelo 2	C (n ⁰)
0-5	0,083	0,072	213	0,004	283	-0,043	283	0,019	230
5-10	-0,047	-0,022	395	0,010	510	-0,040	509	-0,030	398
10-15	-0,065	-0,070	463	-0,024	603	-0,026	603	-0,056	515
15-20	-0,049	-0,051	504	-0,025	641	0,006	641	0,037	522
20-25	0,055	0,018	291	-0,025	431	0,012	430	0,047	312
25-30	0,089*	0,041	229	0,014	337	-0,058	337	-0,105*	237
30-35	0,032	0,121*	130	-0,090	203	0,111*	203	0,122*	112
35-50	-0,106	-0,091	126	0,053	155	-0,036	155	-0,241**	90
50-120	-0,070	-0,062	112	-0,026	123	-0,015	59	0,048	55
120-190	0,001	0,020	165	0,016	117	0,007	101	-0,036	85

C = Número de conexões; *P<0,05; **P<0,01

Tabela 44. Classes de distâncias e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos 6Pgdh, Pgi-1 e Pgi-2 na reboleira 2 da população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Classe (m)	L O C O							
	6Pgdh			Pgi-1			Pgi-2	
	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)	Alelo 1	C (n ⁰)
0-5	-0,051	-0,051	205	0,282**	0,321**	52	0,032	248
5-10	0,021	-0,027	371	0,059	0,118*	102	0,000	423
10-15	-0,023	-0,007	396	-0,121	-0,187*	99	-0,094*	516
15-20	-0,060	-0,050	411	-0,087	-0,061	112	0,023	579
20-25	0,039	0,048	253	-0,090	-0,113	68	0,030	355
25-30	-0,029	-0,032	240	-0,264**	-0,347**	71	-0,078	273
30-35	0,068	0,096	114	-0,034	-0,023	29	0,018	136
35-50	-0,086	-0,052	91	0,379**	0,494**	29	0,076	100
50-120	0,003	0,000	55	-0,023	-0,059	51	0,041	104
120-190	-0,003	-0,007	75	-0,059	0,020	17	-0,126*	116

C = Número de conexões; *P<0,05; **P<0,01

Tabela 45. Classes de distâncias e coeficientes de autocorrelação espacial (I-Moran) para os alelos dos locos enzimáticos Prx-1, Prx-2 e Skdh da reboleira 2 na população MA de *Machaerium villosum* Vog. em Mogi Guaçu, SP. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

L O C O								
Classe (m)	Prx-1			Prx-2		Skdh		
	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)	Alelo 2	C (n ⁰)	Alelo 2	Alelo 3	C (n ⁰)
0-5	-0,001	-0,025	173	-0,010	291	-0,020	0,134*	187
5-10	-0,035	-0,023	342	0,008	523	-0,073	0,041	369
10-15	0,022	0,035	368	-0,039	626	0,010	-0,030	447
15-20	-0,040	-0,050	384	-0,019	642	-0,036	-0,085*	461
20-25	0,075	0,071	235	0,003	424	0,005	-0,045	299
25-30	0,042	0,042	211	-0,006	326	0,074	-0,001	235
30-35	-0,093	-0,093	120	-0,029	187	-0,060	-0,026	124
35-50	0,036	0,036	125	-0,008	149	-0,014	-0,045	89
50-120	-0,100	-0,100	104	0,020	193	0,000	0,149	34
120-190	-0,156**	-0,156**	149	-0,020	209	-0,049	-0,178	33

C = Número de conexões; *P<0,05; **P<0,01