**VARIAÇÃO GENÉTICA EM TRÊS GRUPOS DE INDIVÍDUOS
(ADULTOS, JOVENS E PLÂNTULAS) DE *Calophyllum brasiliense*
Camb. (CLUSIACEAE), EM MATA DE GALERIA**

CRISTINA BORGES KAWAGUICI

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **PAULO YOSHIO KAGEYAMA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luís 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

Outubro – 1999

ERRATA

Pág/Parágrafo/Linha	Onde se lê ...	Leia-se ...
3/Objetivo 2/2	... da região de...	... da região do...
5/5/3	... em dezembro...	... e em dezembro...
9/3/3	... impõem o tipo...	... impõe o tipo...
24/-/6	... (a- Est...)...	... (-Est)...
25/1/2	... diferente...	... diferentes...
45/2/2	... do alelo 1...	... do alelo p...
45/2/4	... do alelo 2...	... do alelo q...
47/2/1	Como discutido anteriormente,...	Possivelmente a causa...
49/1/6	... com em estudo...	... como aqui em estudo...
61/1/3	...Prx-2, 6Pgdh-1 e Pgi-1 das...	... Lap-2 das...
61/1/3	... Mdh-1 e Prx-2 dos...	... 6Pgdh-1, Pgi-1 e lap-2 dos...
61/2/4	... Mdh-1 e Prx-2 dos...	... Skdh-1 e Pgi-1 dos...
67/2/3	... porque obter-se...	... porque para obter-se...

Pág. 26, título da tabela 2, linha 1
Onde se lê: ... grupos...; Leia -se: ... grupo...

Pág 46, coluna Alelos da tabela 8
Onde se lê: P, Q e R em letra maiúscula; Leia-se: p, q e r em letra minúscula.

Pág. 61, continuação do parágrafo 4
O loco Mdh-1 das plântulas não apresentou em EEW, o que não pôde ser explicado em relação à endogamia gerada por autofecundação e/ou acasalamento entre aparentados.

ERRATA DO SUMMARY

In order to investigate the genetic variability of a common forest species, a population of *Calophyllum brasiliense* was studied in the gallery forest of the Panga Ecological Station, Uberlândia-MG, Brazil. This is a tree species that occurs only on water saturated soil distributed along the Panga River, the northern limit of station. Three groups of individuals (adults, youth and seedlings) were studied separately.

Analyses of isozyme electrophoresis were carried out for 30 adult individuals, 30 youths and 100 seedlings of *Calophyllum brasiliense*. It was obtained 22 alleles distributed in 14 enzymatic loci, 8 of which were monomorphic and 6 polymorphic.

Allelic frequencies varied randomly, which did not allow inferences on the occurrence of selection from each individual group to another.

The Wright's F among the groups evidenced low genetic divergence between seedlings and youths (0,0356), seedlings and adults (0,0543) and youths and adults, which indicates little drift effects and/or selection.

The diversity indexes estimated for the population revealed a small number of alleles for each locus ($A_{\text{seedlings}} = 1,71$; $A_{\text{young}} = 1,57$ and $A_{\text{adults}} = 1,64$). The percentage of polymorphic loci was $P = 42,86\%$, a value that is similar to the values commonly found for rare species. The expected mean heterozygosity was larger than that observed in all groups. The observed values for mean heterozygosity are 0,191; 0,138 and 0,141, respectively for seedlings, youths and adults. Hence, most of genetic variability occurs among seedlings. The fixation index was positive for seedlings, youths and adults. This index was higher for the adults, may be because the study area has been colonized recently or the adult individuals are more adapted to the establishment in flooded areas. In the later case, there would be going on a seedling selection for individual establishment ability, which would favor homozygotes.

The estimates of adherence for the Hardy-Weinberg (HWB) balance showed that 50% of the loci in the seedlings and adults met HWB ratios. All loci in the youth group met HWB ratios. These results suggest that mating is not at random in the population and/or the occurrence of selection or drift.

The results of population effective size (N_e) measurements, demonstrated that as endogamy increases, smaller is the significance of effective size estimates. That estimate allow also inferences on the possible strategies of conservation genetics *in situ*, seeking recovery of degraded areas.

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

Kawaguici, Cristina Borges

Variação genética em três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de
Calophyllum brasiliense Camb. (Clusiaceae), em Mata de Galeria / Cristina Borges
Kawaguici. - - Piracicaba, 1999.

98 p. : il.

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

1. Diversidade genética 2. Floresta tropical úmida 3. Genética de população 4.
Izoenzima 5. Umidade do solo I. Título

CDD 634.973 163

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

Quando você começar seu caminho, vai encontrar uma porta com uma frase — diz o mestre, — Volte e me conte qual é esta frase.

O discípulo se entrega de corpo e alma à sua busca.

Chega um dia em que vê a porta, e volta até o mestre.

— Estava escrito no começo do caminho: isto não é possível — diz.

— Onde estava escrito isto, num muro ou numa porta? — perguntou o mestre.

— Numa porta — respondeu o discípulo.

— Pois coloque a mão na maçaneta e abra.

O discípulo obedece. Como a frase está pintada na porta, também vai se movendo com ela. Com a porta totalmente aberta, ele já não consegue mais enxergar a frase — e segue adiante.

MAKTUB, Paulo Coelho

À minha mãe, Neusa, por muito do que sou e pela ousadia de ter criado meus irmãos e a mim praticamente sozinha, com amor e determinação, apesar das dificuldades. Aos meus saudosos, pai Fábio e avó Lira (*in memoriam*), por saber que sempre estiveram do meu lado me protegendo, por serem a minha inspiração e pelos “inesquecíveis” momentos de alegria.

DEDICO

Ao meu marido Vinícius, meu companheiro em todas as situações, que me auxiliou em todas as fases deste trabalho, me incentivou, mas principalmente me deu tranquilidade e carinho nos momentos mais difíceis.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela proteção e por guiar todos os passos da minha caminhada;

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, pela orientação, pelos grandiosos ensinamentos e pela oportunidade na realização desta importante etapa de minha vida;

Ao Prof. Dr. Ivan Schiavini, acima de tudo uma grande pessoa, pela coorientação e por mais uma vez transmitir com brilhantismo seus conhecimentos em princípios e conceitos de ecologia;

Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky, pelo aceite em participar da banca de defesa e pelas valiosas sugestões a respeito deste trabalho;

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Ricardo Rodrigues, Prof. Dr. Antônio Natal e Prof. Ms. Flávio Gandara, pelas sugestões, discussões e críticas, que foram colocadas de forma agradável durante a análise prévia deste trabalho;

Ao colega e coautor Alexandre Magno Sebbenn, que dedicou boa parte de seu precioso tempo para me ajudar, dando sugestões, ensinamentos e auxílio, que foram essenciais para concretização deste trabalho;

Aos colegas de pós graduação do LARGEA, Cristina Lacerda, Helena Maltez, Eduardo Seoane e Flávio Gandara pelas valiosas sugestões e paciência. Aos técnicos do LARGEA, Elza e Gelson, pela contribuição no laboratório e pelo agradável convívio;

À grande amiga , Andréa Vanini, pelos valiosos conselhos e pela valiosa amizade;

Às amigas Andréa, Kátia, Alessandra e Cristiana e ao amigo Alexandre por cederem moradia em Piracicaba e pelos agradáveis momentos de convivência;

Aos colegas de pós graduação, pelos curtos mais agradáveis momentos de diversão;

À Universidade Federal de Uberlândia (Depto. de Biociências), pela “carona” até a reserva, e ao Prof. Paulo E. A. Oliveira pelo interesse no meu trabalho e esclarecimento de minhas dúvidas;

Ao Júlio Rezende e Hubert Rocha, que auxiliaram no trabalho de campo;

À FUTEL, na pessoa do Sr. Lione Tannús Gargalhoni, pelo auxílio, incentivo, apoio e por acreditar em mim, e aos funcionários do Parque do Sabiá, por compreenderem a minha ausência;

À Denise Cunha, pela leitura e correção do summary;

À minha família, mãe, irmãos, avô, sobrinho e sogros, pelo apoio, amor, carinho e incentivo, acima de tudo;

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para término deste trabalho;

À FAPESP, pela concessão de bolsa, de acordo com o processo 96/03655-0.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 A Espécie <i>Calophyllum brasiliense</i> Camb.....	04
2.2 O Ecossistema Mata de Galeria.....	08
2.3 Estrutura de Tamanho Populacional.....	10
2.4 Eletroforese de Isoenzimas.....	12
2.5 Diversidade Genética.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Descrição da Área de Estudo.....	17
3.2 Determinação dos Grupos a serem Analisados na População.....	19
3.3 Mapeamento da População.....	21
3.4 Coleta de Material.....	22
3.5 Procedimento de Laboratório.....	23
3.5.1 Determinação do Protocolo.....	23
3.6 Análise Estatística dos Dados.....	25
3.6.1 Análise das Frequências Alélicas dos Grupos.....	25
3.6.2 Diferenças nas Frequências Alélicas.....	25
3.6.3 Divergência Genética entre os grupos de Indivíduos ($\hat{f}_{ST}$).....	28
3.6.4 Índice de Diversidade Genética.....	29
a) Heterozigosidade Média Observada.....	29

b) Heterozigosidade Média Esperada.....	29
c) Número Médio de Alelos por Loco.....	30
d) Porcentagem de Locus Polimórficos.....	30
e) Índice de Fixação de Wright.....	30
3.6.5 Aderência ao Equilíbrio de Hardy – Weinberg.....	31
3.6.6 Análise de Estrutura Genética entre os Grupos.....	32
3.6.6.1 Análise de Variância de Frequência Alélicas.....	32
a) Análise Individual para cada Grupo.....	32
b) Análise entre e dentro de Grupos.....	35
3.6.7 Tamanho Efetivo.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Obtenção dos Dados Genético.....	40
4.1.1 Procedimento de Eletroforese de Isoenzimas.....	40
4.1.2 Interpretação Genética dos Zimogramas.....	42
4.2 Análise das Frequências Alélicas dos grupos	45
4.3 Índices de Diversidade Genética.....	53
4.4 Aderência ao Equilíbrio de Hardy – Weinberg.....	58
4.5 Tamanho Efetivo.....	63
5 CONCLUSÕES.....	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Aspectos da árvore, flor, semente, tronco e madeira de <i>Calophyllum brasiliense</i> Camb. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999. (Foto: LORENZI, 1992).....	06
2 Mapa de localização da Estação Ecológica do Panga, no município de Uberlândia, MG. Destaque para a cobertura Vegetal e localização da área de estudo. (adaptado de SCHIAVINI, 1992).....	18
3 Mapeamento da Mata de Galeria, em detalhe sua delimitação.....	20
4 Interpretação Genética dos Zimogramas dos Sistemas Enzimáticos Polimórficos Utilizados no Estudo de Plântulas, Jovens e Adultos de uma População de <i>Calophyllum brasiliense</i> Camb. na Estação Ecológica do Panga (Uberlândia – MG). Piracicaba – SP, ESALQ/USP, 1999.....	42

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Solução de extração utilizada em <i>C. brasiliense</i> Camb. Piracicaba – SP, ESALQ/USP, 1999.....	24
2 Frequências alélicas para cada grupos, para a média dos grupos e tamanho da amostra em um loco com dois alelos. ESALQ/USP. 1999..	26
3 Frequências alélicas observadas e esperadas em diferentes grupos. ESALQ/USP. 1999.....	26
4 Frequências genotípicas observadas e esperadas em diferentes grupos. ESALQ/USP. 1999.....	27
5 Esquema da análise de variância de frequência alélicas no modelo hierárquico desbalanceado para adultos, jovens e plântulas de <i>C. brasiliense</i> , em uma população, considerando a espécie como dióica. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.....	33
6 Esquema da análise de variância de frequência alélicas no modelo hierárquico desbalanceado para adultos, jovens e plântulas de <i>C. brasiliense</i> , em uma população, considerando a espécie como hermafrodita. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.....	36
7 Enzimas, sistema de tampão gel/eletrodo e número de locos observados na determinação do protocolo. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.....	41
8 Frequências alélicas para 6 locos isoenzimáticos polimórficos detectados	

e teste de X^2 de contingência em <i>C. brasiliense</i> . (ns: não significativo; *: 5%; **: 1%). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.....	46
9 Estimativa de divergência genética ($\hat{F}_{ST}$) entre Adultos e Jovens, Jovens e Plântulas e Adultos e Plântulas, de <i>C. brasiliense</i> , a partir de 8 locos enzimáticos polimórficos. Piracicaba - SP, ESALQ/USP, 1999.....	47
10 Frequências genotípicas para 6 locos isoenzimáticos polimórficos detectados e teste X^2 de contingência em <i>C. brasiliense</i> . (ns: não significativo; *: 5%; **: 1%). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.....	48
11 Variabilidade genética de uma população de <i>C. brasiliense</i> com base em 14 locos e 8 sistemas enzimáticos (os valores entre parênteses equivalem ao erro padrão da média). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.....	54
12 Índice de Fixação ($\hat{f}$) para 3 grupos de <i>C. brasiliense</i> , locos polimórficos. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.....	55
13 Verificação da aderência das estimativas encontradas para 6 locos polimórficos ao modelo do Equilíbrio de Hardy – Weinberg, através dos testes do χ^2 para o grupo de plântulas de <i>C. brasiliense</i> . Piracicaba - SP, ESALQ/USP, 1999.....	59
14 Verificação da aderência das estimativas encontradas para 6 locos polimórficos ao modelo do Equilíbrio de Hardy – Weinberg, através dos testes do χ^2 para o grupo de jovens de <i>C. brasiliense</i> . Piracicaba – SP, ESALQ/USP, 1999.....	60

15 Verificação da aderência das estimativas encontradas para 6 locos polimórficos ao modelo do Equilíbrio de Hardy – Weinberg, através dos testes do χ^2 para o grupo de adultos de <i>C. brasiliense</i> . Piracicaba – SP, ESALQ/USP, 1999.....	62
16 Teste de equilíbrio de endogamia de Wright (EEW), para o loco Mdh-1 de plântulas de <i>C. brasiliense</i> . ESALQ/USP, 1999.....	63
17 Componentes de variâncias a nível de média de locos para todos os Grupos, Plântulas, Jovens e Adultos, e $\hat{N}_c$, $\hat{N}_c c_c$ e $\hat{f}$. Considerando <i>C. brasiliense</i> como hermafrodita. Piracicaba- SP, ESALQ/USP. 1999.....	64
18 Simulação do tamanho efetivo de <i>C. brasiliense</i> , considerando as proporções sexuais de machos (M) e fêmeas (F) diferentes [1 macho para 1 fêmea (1:1), 1 macho para 2 fêmeas (1:2) e 1 macho para 3 fêmeas (1:3)]. Piracicaba- SP, ESALQ/USP, 1999.....	66

**VARIAÇÃO GENÉTICA EM TRÊS GRUPOS DE INDIVÍDUOS
(ADULTOS, JOVENS E PLÂNTULAS) DE *Calophyllum brasiliense* Camb.
(CLUSIACEAE), EM MATA DE GALERIA**

Autora: CRISTINA BORGES KAWAGUICI

Orientador: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

RESUMO

Com intuito de investigar a variabilidade genética de uma espécie comum, mas com restrição ambiental, foi estudada uma população de *Calophyllum brasiliense*, espécie que ocorre apenas em áreas onde existe saturação hídrica do solo, em 3 grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas). A população estudada está situada na mata de galeria da Estação Ecológica do Panga (Uberlândia- MG), distribuída ao longo do Córrego do Panga que constitui o limite norte da reserva.

A partir da análise de eletroforese de isoenzimas, foram analisados 30 indivíduos adultos, 30 indivíduos jovens e 100 plântulas de *C. brasiliense*. Obteve-se 22 alelos distribuídos entre 14 locos isoenzimáticos, sendo que 8 eram monomórficos e 6 polimórficos.

As frequências alélicas entre os grupos oscilaram de forma aleatória, o que não permitiu inferir sobre ocorrência de seleção de um grupo de indivíduos para outro.

O $\hat{F}_{ST}$ entre os grupos evidenciou divergência genética significativa entre plântulas e jovens (0,0356), plântulas e adultos (0,0543) e jovens e adultos (0,0759), indicando pouco efeito de deriva e/ou seleção.

Os índices de diversidade estimados para a população revelaram baixo número de alelos por loco ($A_{\text{plântulas}} = 1,71$; $A_{\text{jovens}} = 1,57$ e $A_{\text{adultos}} = 1,64$). A porcentagem de locos polimórficos foi de $P = 42,86\%$; esse valor é semelhante aos valores comumente encontrados para as espécies raras. A heterozigosidade média esperada foi maior que a observada em todos os grupos; os valores de heterozigosidade média observada são respectivamente para plântulas, jovens e adultos de 0,191; 0,138 e 0,141, portanto, a maior parte da variabilidade genética se encontra dentro do grupo de plântulas. O índice de fixação ($\hat{f}$) foi positivo para plântulas (0,084), jovens (0,264) e adultos (0,372), mostrando-se mais pronunciado nos adultos. Esse alto índice de fixação pode estar ocorrendo nesse grupo, devido a área de estudo ter sido colonizada recentemente ou, então os indivíduos adultos estão mais adaptados ao estabelecimento em áreas alagadas, desta forma, estaria havendo seleção de plântulas para o estabelecimento de indivíduos adultos, em favor de homozigotos.

O teste de aderência de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) evidenciou que 50% dos locos nas plântulas e nos adultos encontravam-se aderidos a suas proporções. O grupo de jovens encontrava-se nas proporções do EHW. Estes resultados indicam que os acasalamentos não são totalmente aleatórios na população e/ou a presença de seleção ou deriva.

Os resultados de tamanho efetivo ($\hat{N}_e$) demonstraram que, quanto maior a endogamia (adultos), menor é a representatividade do tamanho efetivo. Essa estimativa também inferiu sobre as possíveis estratégias de conservação genética *in situ*, visando recuperação de áreas degradadas.

**GENETIC VARIATION IN THREE GROUPS OF INDIVIDUALS
(ADULTS, YOUNTHS AND SEEDLINGS) OF *Calophyllum brasiliense*
Camb. (CLUSIACEAE), IN GALLERY FOREST**

Author: CRISTINA BORGES KAWAGUICI

Adviser: PAULO YOSHIO KAGEYAMA, Phd.

SUMMARY

With intention of investigating the genetic variability of the usual species, with environmental restriction, it was studied a *Calophyllum brasiliense* population, species that just happens in areas where water saturation of the soil exists, in three groups of individuals (adults, youths and seedlings). The studied population is placed in the forest of gallery of the Ecological Station of Panga, distributed along the river of the Panga, that constitutes the north limit of the reservation.

Starting from the analysis of isozyme electrophoresis, 30 adult individuals were studied, 30 young and 100 seedlings of *Calophyllum brasiliense*. It was obtained 22 alleles distributed in 14 loci enzymatic, and 8 were monomorphic and 6 polymorphic.

The frequencies allelics was aleatory, what didn't allow interference in the occurrence of selection in the individual group for another.

The Wright's F among the groups evidenced low genetic divergence between seedlings and youths (0,0356), seedlings and adults (0,0543) and youngs and adults, that indicates little drift effects and or selection.

The dear diversity indexes for population revealed low alleles number for loci ($A_{\text{seedlings}} = 1,71$; $A_{\text{young}} = 1,57$ and $A_{\text{adults}} = 1,64$). The percentage of polymorphic loci was $P = 42,86\%$, that value is commonly similar to the values found to the rare species. The expected medium heterozygosity was more large than that observed in all the groups, the values observed medium heterozygosity are respectively for seedlings, youths and adults 0,191; 0,138 and 0,141, the more part of genetic variability meets inside of the seedlings group. The fixation index was positive for seedlings, youths and adults, this value was more pronounced in the adults, it's can be occur decause the study area have been colonized recently or then, the adult individuals are more adapted to the establishment in flooded areas, this way, it would be having seedlings selection for the individuals estabilishment, to favour homozygotes.

The estimates of adherence for the Hardy-Weinberg balance didn't evidence differences among the groups, some loci are in balance, others dont's.

The results of effective size, demonstrated that how many large the endogamic, small is the value of the effective size. That estimate also intervence in the possible strategies of conservation genetics in situ, seeking recovery of degraded areas.

1. INTRODUÇÃO

O sudeste brasileiro, assim como o resto do País, vem há muito sofrendo uma degradação contínua de suas florestas naturais, causada nas ultimas décadas por atividades antrópicas, principalmente agropastoris. No geral, as florestas naturais estão hoje restritas a pequenas manchas, ainda livres dos domínios da agricultura.

As matas de galeria constituem um importante ecossistema, possuindo uma abundante diversidade de espécies vegetais e animais. Na região do cerrado brasileiro, apesar de representar pequena porção, destaca-se pela sua riqueza, diversidade genética e pelo seu papel na proteção dos recursos hídricos, edáficos, fauna silvestre e aquática. Essas matas, constituem um potencial refúgio para fauna, principalmente na estação seca, quando a quantidade de alimento, abrigo e umidade ficam escassos. As matas de galeria são importantes também para a manutenção do patrimônio genético de diversas espécies vegetais e funcionam como corredores para dispersão de espécies florestais à longas distâncias.

Pouco se conhece sobre a estrutura e funcionamento desses ambientes florestais, principalmente na região do Triângulo Mineiro. Desta forma, existe a necessidade de estudos intensivos desses ecossistemas, a fim de escolher corretamente as estratégias de manejo e conservação a serem implantadas.

Neste sentido, são raros os casos de espécies estudadas no ponto de vista genético, sendo estes indispensáveis à exploração racional, à recuperação e, principalmente, à conservação dos recursos da floresta tropical. Estes estudos são importantes para que não ocorra a perda de sua diversidade genética natural, permitindo que suas populações mantenham-se vivas e reprodutivas ao longo dos tempos, no ciclo evolutivo da seleção natural.

Uma das principais ferramentas destes estudos consiste no conhecimento do sistema reprodutivo, do fluxo gênico intra e inter populacional, de distribuição espacial dos indivíduos e, principalmente, da distribuição da variação genética entre e dentro de populações das espécies que compõem as comunidades em estudo (Kageyama, 1987).

Utilizando-se da técnica de isoenzimas, autores como Hamrick *et al.* (1979), Hamrick (1983, 1987), Hamrick & Loveless (1986, 1989), Hamrick & Murawski (1991), Loveless & Hamrick (1987), Buckley *et al.* (1988) para *Bertholletia excelsa*, Moraes (1993) para *Myracrodruon urundeuva*, Gandara (1996) com *Cedrela fissilis* Veel., Liengsiri *et al.* (1995) com *Pterocarpus macrocarpus* Kurz., dentre outros, têm estudado a estrutura genética de espécies arbóreas de florestas tropicais.

Neste contexto, propõe-se estudar uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb.(guanandi), em Mata de Galeria, na Estação Ecológica do Panga (Uberlândia-MG), usando-se para tal o método de eletroforese de isoenzimas. Pretendeu-se, obter informações sobre a estrutura genética de 3 grupos de indivíduos dessa população (adultos, jovens e plântulas), verificando se o conjunto de adultos, jovens e plântulas podem ser divergentes geneticamente, e se um processo de seleção está ocorrendo.

Infelizmente, não se têm dados demográficos de longo prazo, ou com indivíduos de todas as faixas etárias bem estudados. Dessa forma, acredita-se que esses dados poderão inclusive dar contribuição relevante a essa discussão.

Assim sendo, considera-se que este estudo possa servir como modelo para espécies de ampla distribuição em ambiente restrito onde há saturação hídrica, sendo muito comum nesses ambientes, igualmente importantes e similares ao guanandi. Essa pergunta contribuirá para o estabelecimento de estratégias de conservação dessas comunidades, assim como inferir corretamente sobre os métodos de manejo a serem aplicados para a conservação da floresta tropical.

A partir do exposto pretendeu-se atingir com este trabalho os seguintes objetivos:

- 1- Definir o protocolo para o estudo de eletroforese de isoenzimas de *C. brasiliense*;
- 2- Quantificar a variabilidade genética de uma população de *C. brasiliense* em mata de galeria da região de Triângulo Mineiro;
- 3- Comparar a diversidade genética em 3 grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *C. brasiliense*.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 A Espécie *Calophyllum brasiliense* Camb.

Vulgarmente conhecida como guanandi, olandi, jacareúma ou mangue, *C. brasiliense* Camb. (Figura 1) é uma espécie vegetal pertencente à Família CLUSIACEAE e chega a atingir cerca de 20-25m de altura e 50-70m de diâmetro. No Brasil, a família está representada por 21 gêneros e 183 espécies, com ampla distribuição, da região Amazônica até o norte de Santa Catarina (Barroso, 1978; Lorenzi, 1992).

Os indivíduos de *C. brasiliense* são arbóreos, apresentando copa larga, tronco reto e cilíndrico; a casca é dura, escura e muito fissurada. As folhas são opostas, de disposição cruzada, cor verde- escura luzente, coriáceas e glabras, apresentam numerosas nervuras laterais muito próximas entre si, paralelas, de aspecto muito característico, estas têm aproximadamente 10-13cm de comprimento por 5-6cm de largura. As flores são brancas e vistosas, polígamas, reunidas em inflorescência racemiformes. Os frutos são drupas globosas, com 1,5-2cm de diâmetro, bastante duros quando secos e seus embriões são globosos, com cotilédones muito crassos, plano convexos e rostilo quase imperceptível. Este é de cor amarelada e, se for feito um corte longitudinal, aparecerá subfusiformes, cinturado, de radícula e plúmula cônicas, entre os cotilédones globosos e unidos (Schvastsman, 1979; Reitz *et al.*, 1978; Lorenzi, 1992; Albuquerque, 1993).

Considerada a primeira madeira de lei do Brasil, *C. brasiliense* é muito utilizada na indústria madeireira, principalmente na fabricação de embarcações (Pio Correa, 1931; Lorenzi, 1992). Sua madeira é moderadamente pesada, fácil de lavar e serrar, o talhe é macio e de belo efeito quando envernizada, com durabilidade moderada (Pio Correa, 1931). Sua casca pode ser utilizada como estopa para calafetagem e a "goma resina" dela retirada pode ser usada como emplasto de aplicação veterinária (Pio Correa, 1931).

Segundo Schvastsman (1979), trata-se de uma espécie tóxica, produzindo, a partir de ferimentos do tronco, látex leitoso fortemente irritante que causa manchas escuras na pele.

C. brasiliense é característico e exclusivo das florestas pluviais, localizadas sobre solos úmidos e brejosos. É capaz de crescer virtualmente dentro da água e até em áreas de mangue (Lorenzi, 1992). Apresenta um caráter perinifólio, com queda de suas folhas pouco evidente, o que está relacionado com a condição hídrica do solo. Os primórdios foliares surgem ainda na estação seca e a brotação desencadeia a floração (Marques, 1994).

A floração da espécie ocorre entre os meses de outubro e novembro (Marques, 1994). Esta grande produção de flores, num intervalo de tempo relativamente pequeno, pode possibilitar a atração de uma diversidade maior de polinizadores.

Segundo Carvalho (1994), o guanandi apresenta floração variável, em virtude de sua ampla dispersão: floresce de setembro a outubro no Distrito Federal, de novembro a junho em São Paulo, em dezembro na Paraíba. Os frutos maduros apareceram disponíveis de maio a junho no Distrito Federal, de junho a outubro em São Paulo, de junho a fevereiro no Panamá e de julho a novembro em Santa Catarina.

Figura 1. Aspectos da árvore, flor, semente, tronco e madeira de *Calophyllum brasiliense* Camb. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999. (Foto: Lorenzi, 1992).

Aparentemente, a espécie apresenta um sistema reprodutivo complexo, pois possui flores hermafroditas e masculinas em indivíduos separados ou em diferentes proporções num mesmo indivíduo (Marques, 1994). A espécie é considerada para uns como sendo hermafrodita e para outros como dióica, sendo a parte masculina das flores hermafroditas não funcionais (Oliveira, informações pessoais)

A frutificação é a fenofase mais longa e os frutos estão disponíveis nas árvores por mais ou menos 10 meses. Produz quase todos os anos grande quantidade de sementes viáveis (Lorenzi, 1992; Marques, 1994; Kawaguici, 1994).

A dispersão do guanandi é ampla (Lorenzi, 1992). Os frutos são dispersos pela água (hidrocoria), por morcegos (quiropterocoria), podendo ainda cair sob a copa da árvore-mãe (autocoria) (Marques, 1994). Esta diversificação no modo de dispersão proporciona uma variedade de microambientes para a germinação das sementes e o estabelecimento das plantas.

A distribuição de diâmetro e altura dos indivíduos de *C. brasiliense* dentro de uma população é do tipo "J" invertido, que indica uma população estável, com taxas constantes de mortalidade e recrutamento (Marques, 1994; Kawaguici, 1994).

A espécie apresenta distribuição espacial do tipo agregada, sendo que essa condição pode ser influenciada por dois fatores. Primeiro, pela forma de dispersão dos frutos, que apresenta vários microambientes diversificados para a germinação das sementes. Isto faz com que a agregação dos indivíduos próximos à planta-mãe, ou nos "poleiros" onde os morcegos carregam os frutos para se alimentarem, fique diluída pela possibilidade de movimentação horizontal dos diásporos, promovida pela corrente de água (Marques, 1994). O segundo fator que influencia a distribuição dos indivíduos é a condição hídrica

do local. A capacidade de *C. brasiliense* se desenvolver normalmente em locais de saturação hídrica faz com que a espécie tenha vantagens sobre outras espécies, o que representa uma distribuição concentrada em regiões mais úmidas. Estas observações já foram registradas para esta espécie (Fischer, 1990; Schiavini, 1992; Marques, 1994 e Kawaguici, 1994).

2.2 O Ecossistema Mata de Galeria

A mata de galeria é uma floresta mesófila, de qualquer grau de decíduidade, que orla em um ou nos dois lados de um curso de água, em uma região onde a vegetação do interflúvio não é uma floresta contínua (Mantovani, 1989).

A transição entre os ambientes aquático e terrestre faz com que os mesmos apresentem características próprias que lhes conferem uma complexidade ecológica (Aciesp, 1987; Nilsson, 1992). Esse ecótono, no qual estão incluídas as formações florestais ocorrentes ao longo de rios, possui distribuição ampla, sendo evidenciado em regiões de domínio de formações abertas e distinto apenas floristicamente em áreas onde há predomínio de formações florestais (Troppmair & Machado, 1974; Aciesp, 1987; Rodrigues, 1989).

Apesar da controvérsia na utilização dos termos mata “de galeria”, “ciliar” ou “ripária” (Troppmair & Machado, 1974; Mantovani *et al.*, 1989 ; Rodrigues, 1992), a importância da vegetação existente ao longo dos cursos de água tem sido ressaltada em vários trabalhos (Rodrigues, 1992; Aidar, 1992). Entretanto o termo “Mata Ciliar” tem abrangência mais ampla do que o termo “Mata de Galeria”. Mata Ciliar tem sido utilizado para a vegetação florestal ocorrente em rios de grande largura, onde a copa das árvores de ambas as

margens não se tocam, permitindo a entrada direta e a influencia da luz sobre a vegetação mais próxima ao rio. Já nas Matas de Galeria, as copas das árvores de ambas as margens formam a galeria propriamente dita, o que permite condições ambientais, sobretudo luz e temperatura, diferenciadas para o corpo d'água e para a vegetação das margens do rio (Ribeiro & Schiavini, 1998).

A função hidrológica das Matas de Galeria está associada à estabilização das áreas ribeirinhas, ao controle dos ciclos de nutrientes da bacia hidrográfica, à manutenção da qualidade da água, além de propiciar a sobrevivência dos organismos aquáticos e ribeirinhos (Lima, 1989).

As Matas de Galeria atuam como barreira física, regulando os processos de troca entre os sistemas terrestre e aquático, desenvolvendo condições propícias à infiltração (Kageyama, 1986; Lima, 1989). Sua presença reduz significativamente a possibilidade de contaminação dos cursos d'água por sedimentos, resíduos de adubos, defensivos agrícolas, conduzidos pelo escoamento superficial da água no terreno (Resende, 1998).

Pela própria natureza do ecossistema, as Matas de Galeria encontram-se em transição quanto ao solo e os gradientes de umidade dele. Este último geralmente impõem o tipo de vegetação, indicando espécies adaptadas, tolerantes ou indiferentes a solos encharcados ou sujeitos a inundações temporárias (Kageyama *et al.*, 1989).

Essas matas são influenciadas principalmente pelas características do rio e da topografia local, que determinarão a frequência e duração das inundações (Rodrigues, 1989, 1992). Estes fatores são muito variáveis, que formam um verdadeiro mosaico de situações (Joly, 1986) e que atuará na seleção e distribuição das espécies arbóreas, resultando em uma estrutura de composição florística bastante heterogênea (Nilsson *et al.*, 1988; Mantovani *et al.*, 1989; Rodrigues, 1992).

Se a Mata de Galeria for considerada como aquela área diretamente influenciada por flutuações do lençol freático, observa-se o predomínio de poucas espécies, o que pode ser considerado como uma tendência normal dessas formações florestais devido às especificidades deste ambiente. Essas condições locais favorecem o estabelecimento de certas hegemonias na vegetação, por meio de espécies preferencias que normalmente exibem ampla dominância local. Esse tipo de vegetação possui mais de uma centena de espécies arbóreas por hectare, com baixa densidade por hectare para cada espécie. Essa variabilidade de espécies é acompanhada de intensa relação da vegetação com insetos, pássaros e mamíferos responsáveis pelo transporte de pólen e sementes (Kageyama, 1986).

2.3 Estrutura de Tamanho Populacional

A estrutura de tamanho de uma população pode demonstrar a sua regeneração do passado e do presente (Knowles & Grant, 1983; Agren & Zackrisson, 1990).

Segundo Daubenmire (1972), em uma comunidade climática espera-se encontrar uma série completa de classes de tamanho para cada uma das espécies que compõe o ecossistema, posto que, para cada planta que morre ou envelhece, uma outra, imediatamente mais nova, deve estar disponível para substituí-la. Quando uma série é interrompida ou truncada, o ciclo de vida não está sendo completado e a espécie, geralmente, não pode ser considerada como em equilíbrio no ambiente. Portanto, populações em equilíbrio apresentam histogramas de frequências de classes de diâmetro como uma série geométrica decrescente (Martins, 1991).

Algumas populações de plantas mostram uma distribuição de altura e diâmetro com predominância de indivíduos nas classes menores e poucos nas maiores (Solbrig, 1981). Esta distribuição pode ser representada por uma curva do tipo “J invertido”, que indica uma população estável, com taxas constantes de mortalidade e recrutamento (Hett & Loucks, 1976; Silvertown, 1987; Agren & Zackrisson, 1990).

Segundo Weiner (1985), o padrão “J invertido” é explicado por uma interferência dos indivíduos adultos sobre os mais jovens, com desvio de recursos para os primeiros. Webb *et al.* (1972) sugeriram ainda que a presença de muitas plântulas e o rápido crescimento em condições apropriadas resultariam nesta distribuição. A variação no ciclo reprodutivo com o decorrer do tempo também pode ter grande influência na estrutura de tamanho de uma população (Ramirez & Arroyo, 1990).

Este padrão de distribuição já foi relatado por vários autores em árvores de regiões tropicais e, no Brasil, destacam-se os trabalhos com *Emmotum nitens* (Moreira, 1987), *Kielmeyera coriacea* (Oliveira *et al.* 1989), em áreas de cerrado, *Pithecolobium racemosum* (Leite *et al.* 1982) na Amazônia, *Euterpe edulis* (Silva, 1991) em floresta semidecídua, *Inga affinis* (Lieberg, 1990), *Centrolobium tomentosum* (Aidar, 1992), *Copaifera langsdorffii* (Leite & Salomão, 1992; Resende, 1994) e em *Calophyllum brasiliense* (Marques, 1994; Kawaguici, 1994) em mata ciliar/ galeria.

Se o modelo “J invertido” representar a realidade, uma menor frequência nas classes inferiores deve indicar problemas na regeneração, tais como: deficiência na população e condições inadequadas para o estabelecimento de plântulas (Maltez, 1997).

Janzen (1970) e Connell (1971) propõem que a sobrevivência dos indivíduos de uma população podem estar relacionados com fatores

influenciados pela densidade ou pela mortalidade associada à distância entre plântula e árvore mãe.

Em populações de plantas, a sobreposição de gerações, através da existência concomitante de indivíduos reprodutivos de diversas classes de tamanho (diversas idades), pode ter importantes implicações sobre a estrutura genética dessas populações, permitindo fluxo gênico entre indivíduos que não se cruzariam caso não houvesse tal sobreposição (Maltez , 1997).

2.4 Eletroforese de Isoenzimas

As técnicas de eletroforese de isoenzimas são de grande utilidade para a obtenção de informação genética referente a indivíduos de populações naturais. As enzimas e proteínas de muitos organismos mostram uma grande variação em sua mobilidade eletroforética entre indivíduos.

A eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas (proteínas e aminoácidos) em um campo elétrico, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares. A migração é no sentido do eletrodo de sinal contrário ao seu (Alfenas *et al.*, 1991).

Em comparação com ensaios de progênies de campo, a eletroforese possui vantagem, pois os estudos podem ser desenvolvidos em pouco tempo, com custo menor e com baixo efeito ambiental (Kageyama, 1990), embora forneçam tipos de informações genéticas diferentes. Outras grandes vantagens das isoenzimas são suas propriedades de alelos com expressão codominante, padrão de herança mendeliana e ausência de epistasia e pleiotropia (Wendel & Weeden, 1989).

A utilização da eletroforese de isoenzimas, para descrever a distribuição da variação genética em populações naturais, apresenta inúmeras

vantagens: a) a herança genética dos traços detectados eletroforéticamente podem ser facilmente demonstradas; b) a maioria dos locos alozimáticos são codominantes e as frequências alélicas podem ser calculadas sem a necessidade de cruzamentos genéticos; c) a estimativa da variação genética pode ser comparada diretamente entre populações ou espécies (Hamrick *et al.*, 1979).

Moraes (1993), estudando a variabilidade genética de duas populações de *Myracroduton urundeuva* F.F. & M.F. Allemão, por isoenzimas e caracteres quantitativos, apresenta vantagens do primeiro método sobre o segundo.

Alfenas *et al* (1991) descrevem o método de eletroforese de isoenzimas com detalhes para essências florestais. Moraes (1993), por sua vez, faz um levantamento dos sistemas enzimáticos mais utilizados em coníferas e angiospermas, citando para as últimas a Mdh, Aat, Lap, Per, Pgi, Pgm, Skdh, Acp, G6pd, Idh e Est. Testou, ainda, estes sistemas com duas populações de aroeira, além do Adh, α -Est, β -Est, Ald, G2d, Gdh e Me.

2.5 Diversidade Genética

A floresta tropical úmida é sem dúvida o ecossistema de maior diversidade de espécies e complexidade de relações ecológicas, sendo um modelo de difícil entendimento para a conservação de seus recursos *in situ*. Além do mais, nestes ecossistemas faltam muitos estudos de diversidade genética, sendo este o maior desafio existente aos conservacionistas de recursos genéticos (Kageyama, 1987).

Estudos de estrutura genética das espécies de ecossistemas de matas ciliares são fundamentais para o estabelecimento de critérios adequados

de amostragem das populações, para serem utilizados na recomposição de matas ciliares objetivando a manutenção de sua diversidade, sendo desta forma necessário entender não só a diversidade das espécies desses ecossistemas, como também a variação genética entre e dentro de suas populações (Kageyama *et al.*, 1989).

Segundo os autores acima citados podem, ainda, existir outros fatores de restrições ao fluxo gênico para espécies exclusivas destes ecossistemas, como a área restrita ao longo das margens dos rios, com as populações formando um corredor no sentido montante justante, com conseqüente diminuição do tamanho da vizinhança. Outro aspecto importante do fluxo gênico unidirecional, via sementes no sentido montante justante, é que as populações mais próximas à nascente têm uma entrada muito menor de genes via semente do que as populações mais próximas à foz do rio, o que vai aumentar a diversidade destas ultimas populações.

Do ponto de vista da conservação genética as plantas podem ser divididas em dois grupos, dependendo do fato de serem predominantemente autopolinizadas (autógamas) ou serem, em grande parte, de polinização cruzada (alógamas). A determinação da forma preferencial de acasalamento é importante para a correta determinação dos métodos de melhoramento e conservação a serem aplicados à espécie estudada, já que estas estratégias diferem para diferentes sistemas reprodutivos (Dias & Kageyama, 1982).

A diversidade genética ou a variação devido a diferenças nos alelos pode ocorrer a diferentes níveis: i) de espécie dentro de ecossistemas, ii) de populações dentro de espécies; e iii) de indivíduos dentro de populações; sendo a caracterização destes níveis de diversidade básicos para o planejamento das estratégias de conservação genética (Kageyama, 1987).

O estudo da variação genética em populações naturais envolve duas questões básicas: a primeira é descrever os níveis de variação genética

mantida dentro das populações de espécies; a segunda, de particular importância para a conservação genética, é como a variação genética é partida entre e dentro de populações. Em espécies de plantas, as principais características que influenciam a distribuição da diversidade genética incluem o tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica da espécie, o modo de reprodução primário, o sistema de cruzamento, o mecanismo de dispersão de sementes, e o tipo de comunidade que a espécie comumente ocorre (Hamrick, 1982).

Moraes (1993), estudando a variabilidade genética de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão, por isoenzimas e caracteres quantitativos, obteve como principais conclusões: i) que as técnicas de eletroforese mostraram-se eficientes no estudo de genética de populações de aroeira, na fase de plântula; ii) as populações estudadas apresentaram uma expressiva taxa de endogamia; baixa taxa aparente de fertilização cruzada; e iii) resultados da variação genética entre e dentro das populações, analisadas pelas características quantitativas apresentaram-se próximas ao obtido pelo método de isoenzimas.

Loveless & Hamrick (1987), estudando a estrutura genética de espécies arbóreas tropicais por isoenzimas, encontraram no geral uma alta diversidade genética total ($H_t=0,352$), baixa diversidade relativa entre as populações ($G_{st}=0,005$), e que o fluxo gênico entre as populações ocorre pelo vento para algumas espécies e por animais para outras. Observaram, ainda, dois padrões de distribuição: o espacial, que é a distribuição dos genótipos em uma população; e o temporal, que leva ao espacial, que é o fluxo gênico, determinado pela forma de dispersão e polinização.

Hill *et al.* (1978), em estudo da variação genética de espécies leguminosas ribeirinhas ao longo do Rio Solimões, na Amazônia, observaram que os índices de heterozigosidade e de similaridade genética, os padrões

demográficos e a biologia indicam estreita correlação entre variabilidade genética e a estratégia adaptativa. As populações com alta probabilidade de extinção são mais homozigotas que as com maior probabilidade de sobrevivência, isto é, populações que sofrem perturbações são mais homozigotas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da Área de Estudo

O trabalho de campo foi realizado na Estação Ecológica do Panga, que compreende uma área de 403,85 hectares localizada no sul do município de Uberlândia, MG (Figura 2).

O clima da região é do tipo Aw, com verão quente e úmido e inverno frio e seco (Schiavini, 1992).

Na Estação Ecológica do Panga, são encontrados os principais tipos fisionômicos que caracterizam a região de cerrados do Brasil Central. Encontram-se representados tipos florestais como Mata Mesófila (de galeria e de encosta) e Mata Xeromórfica (Cerradão); diversos tipos savânicos, como o Cerrado (sentido restrito), Campo Cerrado e Campo Sujo, além do tipo campestre, representado pelos Campos Úmidos e Veredas (Schiavini & Araújo, 1989).

Dentre os tipos de vegetação, a área escolhida para o estudo foi a Mata de Galeria, distribuída principalmente ao longo do Córrego do Panga que constitui o limite norte da reserva e, em menor escala, nos canais de drenagem e pequenos córregos existentes na porção sudeste da reserva. A mata de Galeria ocupa os vales de canais de drenagem bem marcados, ou cabeceiras de nascentes, sempre associadas a solos bastante úmidos e, algumas vezes, encharcados (Schiavini & Araújo, 1989).

Figura 2. Mapa de localização da Estação Ecológica do Panga, no município de Uberlândia, MG. Destaque para a cobertura Vegetal e localização da área de estudo. (adaptado de Schiavini, 1992).

A Mata de Galeria possui em torno de 5 hectares em todo seu limite e extensão, e é limitada de um lado pelo Córrego do Panga e de outro por uma faixa de Campo Úmido, ao longo de toda sua borda, apresentando uma mudança brusca da vegetação (Figura 3).

C. brasiliense é uma espécie muito comum (230 indivíduos adultos por hectare) na área de estudo. Segundo Schiavini (1992), a espécie foi considerada uma das 10 primeiras com maior IVI (índice de valor de importância), ocorrendo em toda extensão da Mata de Galeria.

3.2 Determinação dos Grupos a Serem Analisados na População

Para considerar os indivíduos de *C. brasiliense* da população estudada como adultos, jovens e plântulas, estabeleceu-se a seguinte metodologia:

Adultos:

Indivíduos que apresentam acima de 15cm de CAP (circunferência à altura do peito):

Jovens:

Indivíduos que apresentam de 7 a 15cm de CAP:

Plântulas:

Indivíduos que apresentam até 7cm de diâmetro e maiores que 30cm de altura.

Como não houve frutificação dos indivíduos no ano de coleta, não foram encontradas plântulas muito pequenas, por isso considerou-se plântulas aquelas maiores que 30cm de altura.

Figura 3. Mapeamento da Mata de Galeria, em detalhe sua delimitação.

Através dessa metodologia foi possível analisar indivíduos de vários estratos da população estudada. Um estudo de estrutura populacional de *C. brasiliense*, na Estação Ecológica do Panga, demonstrou que são distribuídos na população indivíduos de todos os tamanhos, sendo que em maior quantidade nas classes de menor tamanho (Kawaguici, 1994) .

3.3 Mapeamento da População

Durante as visitas realizadas na área de estudo, a população foi delimitada, os indivíduos foram marcados e suas folhas coletadas.

A amostragem dos indivíduos na área de estudo foi aleatória, os indivíduos foram marcados numa extensão de 100m à margem do Rio Panga e em todo seu limite (de um lado o Rio Panga e de outro uma faixa de campo úmido). Foram marcados 30 indivíduos adultos, 30 jovens e 100 plântulas da espécie. Todos os indivíduos marcados tiveram seus diâmetros e altura medidos.

O intuito de se coletar um maior número de plântulas foi devido ao fato de se encontrar um maior número de indivíduos neste estágio e da grande mortalidade desses indivíduos. A predominância da mortalidade no estágio de plântula é esperada e pode ser justificada por estresses por água, herbivoria (Mantovani, 1989) e seleção natural. Isso deve-se ao fato de que a susceptibilidade das plântulas situa-se logo após o recrutamento, quando deixam de depender das próprias reservas e passam a depender de fatores externos. E, também, pelo fato de que as plântulas são mais susceptíveis a danos catastróficos como queda de árvores, alagamentos, pisoteio, etc, que levaria à morte (Lobo,1993).

Para cada estágio da planta (adulto, jovem e plântula), utilizou-se uma metodologia para obtenção da altura e do CAP (circunferência a altura do peito) dos indivíduos marcados no campo.

Nos adultos a altura dos indivíduos foi estimada; o CAP foi medido com auxílio de fita métrica. Nos jovens, a altura dos indivíduos foi medida com trena quando possível ou estimada; o CAP foi medido com fita métrica. A altura das plântulas foi medida utilizando fita métrica e o diâmetro foi medido utilizando paquímetro.

Todos os indivíduos medidos foram marcados com placas de alumínio numeradas e mapeados utilizando papel milimetrado.

3.4 Coleta de Material

A coleta das folhas foi realizada na parte da manhã, quando a temperatura se encontra mais amena e a umidade no material vegetal maior. As folhas foram coletadas com auxílio de um podão. Coletou-se as folhas de melhor qualidade possível, ou seja, saudáveis, evitando-se folhas predadas ou parasitadas (fungos), ressecadas e velhas, de preferência sem musgos ou outros que causassem um maior trabalho na sua limpeza. Teve-se preferência às folhas das pontas dos ramos, não expostas diretamente ao sol, em geral as mais saudáveis. Manteve-se os ramos, pois esses impedem de certo modo que a água das folhas se evaporarem rapidamente, até o momento da extração. Envolveu-se as folhas em jornal, evitando oxidação devido ao contato com a água. Essas foram colocadas em sacos plásticos numerados evitando o ressecamento e foram inseridas no isopor com gelo, em saco plástico, isolado por um jornal.

Após a coleta de todos os indivíduos (adultos, jovens e plântulas), transferiu-se todo o material para um refrigerador e, em seguida, foi transferido para a ESALQ/USP, onde foram preparados para eletroforese no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA).

3.5 Procedimento de Laboratório

3.5.1 Determinação do Protocolo

O protocolo para os sistemas enzimáticos de *C. brasiliense* foi baseado em Alfenas *et al.* (1991), com adaptações para espécies arbóreas tropicais estudadas pelo grupo de pesquisadores do LARGEA, ESALQ/USP. Nas corridas de eletroforese com *C. brasiliense*, buscou-se sistemas isoenzimáticos que apresentavam boa resolução para posterior análise dos resultados.

A extração das enzimas foi feita através da maceração de aproximadamente 20mg de tecido de limbo foliar em placas de porcelana resfriadas utilizando-se cerca de 10mg de areia lavada, Polyvinyl - Pyrrolidone (PVP-360) e Polyvinyl Polypyrrolidone (P-6755) e 200ml de Solução de extração 1 citada por Alfenas *et al.* (1991) e modificada por Gandara (1996) (Tabela 1).

Os extratos obtidos foram absorvidos em papel de filtro, com 6x10mm, sendo em seguida colocados no gel. Foram colocados dois pedaços de papel de filtro contendo solução marcadora de azul de bromofenol a 0,1% nas extremidades do gel.

Para a escolha dos sistemas enzimáticos, foram realizadas análises preliminares de 17 sistemas isoenzimáticos, abaixo relacionados:

- . Fosfoglucomutase (Pgm - EC 2.7.5.1)
- . 6 - Fosfogluconato Desidrogenase (6Pgdh - EC 1.1.1.44)
- . Glucose Desidrogenase (Gludh - EC 1.1.1.47)
- . Fosfoglucose Isomerase (Pgi - EC 5.3.1.9)
- . Glucose - 6 - Fosfato Desidrogenase (G6pdh - EC 1.1.1.49)
- . Glicerato - Desidrogenase (G2dh - EC 1.1.1.29)
- . Glutamato - Oxalacetato Transaminase (Got - EC 2.6.1.1)
- . Isocitrato Desidrogenase (Idh - EC 1.1.1.42)
- . Leucina Aminopeptidase (Lap - EC 3.4.11.1)

- . Malato Desidrogenase (Mdh - EC 1.1.1.37)
- . Manitol Desidrogenase (Madh - EC 1.1.1.67)
- . Superóxido Dismutase (Sod - EC 1.15.1.1)
- . Xiquimato Desidrogenase (Skdh - EC 1.1.1.25)
- . Álcool Desidrogenase (Adh - EC 1.1.1.25)
- . Esterase (α -Est - EC 3.1.1.1)
- . Fosfatase Ácida (Acp - EC 3.1.3.2)
- . Peroxidase (Prx - EC 1.11.1.7)

Tabela 1. Solução de extração utilizada em *C. brasiliense* Camb. Piracicaba – SP. ESALQ/USP, 1999.

COMPOSTO	QUANTIDADE
Fosfato de Sódio bibásico (0,034M)	0,6g
Sacarose (0,2M)	7g
Polivinil pirrolidona PVP-40 (2,56%)	2,56g
L-ácido ascórbico	100mg
Dietilditiocarbamato DIECA (5,8mM)	100mg
Bissulfito de Sódio (2,6mM)	50mg
Borato de Sódio (2,6 mM)	50mg
Polietilenoglicol-6000 (1%)	1g
Água destilada (q.s.p.)	100ml

Foram também testados 4 sistemas de tampão gel/eletrodo: tris - citrato TC (Soltis *et al.*, 1983), citrato morfolina CM (Clayton & Tretiak, 1972), histidina (H) (Stuber *et al.*, 1988) e tris citrato borato (TCB) (Alfenas *et al.*, 1991).

3.6 Análise Estatística dos Dados

3.6.1 Análise das Frequências Alélicas dos Grupos

As frequências alélicas descrevem a variação para um loco e foram obtidas pela contagem direta do número de alelos por loco, dividido pelo número total de alelos no loco, da seguinte forma:

$$\hat{p}_{ij} = n_{ij}/n_j$$

em que:

$\hat{p}_{ij}$ = frequência do alelo i na população j;

n_{ij} = número de ocorrência do alelo i na população j;

n_j = número total de alelos amostrados na população j.

Estas estimativas foram obtidas a partir do programa BIOSYS- 2, desenvolvido por Swofford & Selander (1997).

3.6.2 Diferenças nas Frequências Alélicas entre Grupos

Para verificar se as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos eram diferente, aplicou-se um teste qui-quadrado (χ^2) de contingência, comparou-se todos os grupos simultaneamente, e separadamente de dois a dois. O teste de χ^2 de contingência, para frequências alélicas de diferentes grupos, foi realizado comparando-se as frequência observadas contra as esperadas em relação a média dos grupos, conforme Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Freqüências alélicas para cada grupos, para a média dos grupos e tamanho da amostra em um loco com dois alelos. ESALQ/USP. 1999.

Alelos	Plântulas	Jovens	Adultos	Média
N	N_1	N_2	N_3	
p	p_1	p_2	p_3	$\bar{p} = \frac{p_1 + p_2 + p_3}{3}$
q	q_1	q_2	q_3	$\bar{q} = \frac{q_1 + q_2 + q_3}{3}$

Tabela 3. Freqüências alélicas observadas e esperadas em diferentes grupos. ESALQ/USP. 1999.

Alelos	Freqüências alélicas observadas			Freqüências alélicas esperadas		
	Plântulas	Jovens	Adultos	Plântulas	Jovens	Adultos
p	$p_1 N_1$	$p_2 N_2$	$p_3 N_3$	$\bar{p} N_1$	$\bar{p} N_2$	$\bar{p} N_3$
q	$q_1 N_1$	$q_2 N_2$	$q_3 N_3$	$\bar{q} N_1$	$\bar{q} N_2$	$\bar{q} N_3$

$$\chi^2_{Contingência} = \frac{(p_1 N_1 - \bar{p} N_1)^2}{\bar{p} N_1} + \frac{(p_2 N_2 - \bar{p} N_2)^2}{\bar{p} N_2} + \dots + \frac{(q_3 N_3 - \bar{q} N_3)^2}{\bar{q} N_3}$$

$$GL = (n - 1)(s - 1)$$

onde :

N_i = tamanho da amostra;

n = número de alelos;

S = número de populações.

O teste de χ^2 de contingência para frequências genotípicas de diferentes grupos foi realizado comparando-se as frequências observadas contra as esperadas em relação a média dos grupos, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Frequências genotípicas observadas e esperadas em diferentes grupos. ESALQ/USP. 1999.

Alelos	Frequências alélicas observadas				Frequências alélicas esperadas		
	Plântulas	Jovens	Adultos	Média	Plântulas	Jovens	Adultos
A_1A_1	P_1	P_2	P_3	$\bar{P}$	P_1	P_2	P_3
A_1A_2	H_1	H_2	H_3	$\bar{H}$	H_1	H_2	H_3
A_2A_2	Q_1	Q_2	Q_3	$\bar{Q}$	Q_1	Q_2	Q_3
	N_1	N_2	N_3	$\bar{N}$			

$$P_i = (\bar{P} / \bar{N}) \times N_i$$

$$H_i = (\bar{H} / \bar{N}) \times N_i$$

$$Q_i = (\bar{Q} / \bar{N}) \times N_i$$

$$\chi^2_{Contingência} = \frac{(P_1 - P_1)^2}{P_1} + \frac{(P_2 - P_2)^2}{P_2} + \dots + \frac{(Q_3 - Q_3)^2}{Q_3}$$

$$GL = (n - 1)(s - 1)$$

onde :

N_i = tamanho da amostra;

n = número de alelos;

S = número de populações.

3.6.3 Divergência Genética entre Grupos de Indivíduos ($\hat{F}_{ST}$)

$\hat{F}_{ST}$ corresponde à divergência genética nas frequências alélicas. O $\hat{F}_{ST}$ foi estimado entre jovens e adultos, jovens e plântulas e adultos e plântulas. Como a estatística F divide é uma medida de variância entre frequências alélicas de diferentes grupos, ela pode ser utilizada para comparar diferentes grupos estruturados no espaço, bem como no tempo, de acordo com Vencovsky (informações pessoais).

Reis (1996), trabalhando com *Euterpe edulis*, utilizou o $\hat{F}_{ST}$ para comparar frequências alélicas de óvulo e pólen. Lepsch-Cunha (1996) usou a estatística $\hat{F}$ para comparar além do pólen e óvulo, as frequências alélicas entre 12 famílias, em *Couratari guianenses*. Gandara (1996), em *Cedrela fissilis*, comparou pólen com óvulo, óvulo com árvores adultas e pólen com árvores adultas. Sebbenn (1997) utilizou os $\hat{F}_{ST}$ para comparar as frequências entre sexos, entre pólen e óvulo, pólen e árvores masculinas, óvulos e árvores femininas e heterogeinidade nas frequências alélicas do pólen em *Genipa americana*.

O $\hat{F}_{ST}$ foi obtido através do programa BIOSYS-2 de Swofford & Selander (1997), baseado no modelo de Weir & Cockehan (1984).

O teste de significância para $\hat{F}_{ST}$ a nível de locos, foi obtido pelo χ^2 de contingência, da mesma forma como é apresentado no item 3.6.2.

Para testar a significância da média de $\hat{F}_{ST}$, utilizou-se um teste de aleatorização sobre os locos ou o “Jackknife”.

3.6.4 Índice de Diversidade Genética

Para estimativa de parâmetros que medem a diversidade foi utilizado o programa BIOSYS-2 de Swofford & Selander (1997), onde foram feitas as estimativas das heterozigosidade média observada e esperada por loco (H_o , $\hat{H}_e$), número médio de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos (P) e índices de fixação de Wright ($\hat{f}$), da seguinte forma:

a) Heterozigosidade Média Observada (H_o)

A heterozigosidade média Observada (H_o) para cada loco foi obtida pela expressão:

$$H_o = 1 - \sum P_{ii}$$

em que:

P_{ii} = frequência dos genótipos homozigotos;

Calculou-se individualmente cada loco e para a média dos locos (média aritmética considerando locos monomórficos).

b) Heterozigosidade Média esperada ($\hat{H}_e$)

A heterozigosidade média esperada, segundo as expectativas do equilíbrio de Hardy- Weinberg, foi estimada para cada loco , conforme Nei (1977):

$$\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$$

em que:

P_i = frequência alélica estimada do i ésimo alelo.

A heterozigosidade média esperada foi obtida para cada loco e para a média dos locos [média aritmética entre todos os locos analisados (polimórficos e monomórficos)].

c) Número Médio de Alelos por Loco (A)

O número médio de alelos por loco foi obtido somando-se todos os alelos observados e dividindo esse número pelo número total de locos amostrados.

d) Porcentagem de Locos Polimórficos (P)

Para a estimativa da porcentagem de locos polimórficos foram considerados os locos que apresentavam frequência do alelo mais comum igual ou inferior a 95%. A porcentagem de locos polimórficos foi calculada dividindo-se o número locos polimórficos pelo número total de locos amostrados.

e) Índice de Fixação de Wright ($\hat{f}$)

O índice de fixação de Wright, ou coeficiente de endogamia, foi estimado a nível de locos e média entre locos, segundo Vencovsky (1994), com segue:

$$\hat{f} = 1 - H_o/\hat{H}_e \text{ (nível de loco)}$$

$$\hat{f} = 1 - \sum H_o / \sum \hat{H}_e \text{ (média ponderada entre locos)}$$

Este índice permite acessar os níveis de fixação alélicas por loco, bem como em nível de média de locos, informando sobre o grau de endogamia dentro das populações.

A significância do $\hat{f}$ foi obtida a partir de um “Bootstrapping” com 10.000 repetições entre locos, num intervalo de confiança a 95% . Essa estimativa foi obtida pelo programa GDA (Lewis & Zaykin, 1999).

3.6.5 Aderência ao Equilíbrio de Hardy - Weinberg

Através do programa BIOSYS-2 de Swofford & Selander (1997), testou-se a adequação dos grupos (adultos, jovens e plântulas) ao equilíbrio de Hardy – Weinberg.

O teste utilizado foi o qui-quadrado (χ^2) não agrupado, porém , quando os valores das frequências genóticas esperadas se apresentavam menores do que 1,00, eram agrupados em classes como: homozigotos para os alelos mais comuns, heterozigotos comuns/raros, homozigotos raros e outros heterozigotos, e testados pelo χ^2 agrupado e exato de Fischer. Segundo Weir (1990) e Gomes (1990), esse teste é mais adequado e seguro quando os números esperados nas células têm valores pequenos.

3.6.6 Análise de Estrutura Genética dos Grupos (Adultos, Jovens e Plântulas)

Afim de estimar o tamanho efetivo populacional (N_e) dos grupos de indivíduos de *C. brasiliense*, realizou-se análise de variância das frequências alélicas para cada grupo segundo o modelo de Vencovsky (1992) e Weir (1996).

3.6.6.1 Análise de Variância de Frequências Alélicas

As análises de variâncias foram obtidas a partir do programa GDA (Lewis & Zaykir, 1999).

Esta análise foi inicialmente realizada ao nível de alelo e, posteriormente, conjunta para todos os alelos. Para cada alelo de cada loco polimórfico das plantas adultas, jovens e das plântulas foi feita a análise de variância no modelo aleatório hierárquico desbalanceado, baseado em Weir (1990). Assim, de acordo com estes autores, a variável x_{ij} corresponde ao gene “i” na população “j”, portanto, quando x_{ij} estava presente recebeu o valor um, e quando estava ausente recebeu o valor zero.

a) Análise individual para cada Grupo: Adultos, Jovens e Plântulas

A análise de frequências gênicas de indivíduos adultos, jovens e plântulas de *C. brasiliense* como uma população baseou-se no modelo:

$$Y_{ik} = \mu + b_i + g_{k(i)}$$

onde :

Y_{ik} : frequência do gene i , dentro do indivíduos K ;

m : média geral da frequência alélica;

b_i = efeito de indivíduos, com $i= 1,2,..., a$;

$g_{k(i)}$: efeito do gene k , dentro do indivíduo i , com $k= 1,2,..., b_i$;

As estimativas dos componentes de variância para os 3 grupos foram obtidas pela decomposição das esperanças dos quadrados médios da análise de variância, conforme Tabela 5, desse modo:

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

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

Tabela 5: Esquema da análise de variância de frequência alélicas no modelo hierárquico desbalanceado para adultos, jovens e plântulas de *C. brasiliense*, em uma população, considerando a espécie como dióica. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

FV	GL	SQ	QM	$E(QM)^1$
Indivíduos	$\sum_{i=1}^a b_i, -a$	SQ_I	QM_I	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2$
Genes/Indivíduos	$n.. - \sum_{i=1}^a b_i$	SQ_G	QM_G	$\hat{\sigma}_G^2$
Total	$n-1$			

O significado genético dos componentes da variância são definidos abaixo:

$$\hat{\sigma}_I^2 = p(1-p)(\hat{f})$$

$$\hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)(1-\hat{f})$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_I^2 / (\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2) = p(1-p)$$

onde: p = frequência de um gene em um determinado loco;

$\hat{f}$ = correlação entre alelos dentro de indivíduos;

$\hat{\sigma}_I^2$ = variância entre indivíduos dentro da população;

$\hat{\sigma}_G^2$ = variância entre genes dentro de indivíduos;

$\hat{\sigma}_T^2$ = variância genética total.

A estimativa do $\hat{f}$ pode ser obtida dos componentes da variância, da seguinte forma:

$$\hat{f} = \hat{\sigma}_I^2 / (\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2)$$

As estimativas médias dos valores de $\hat{f}$ foram obtidas pela soma dos quadrados médios individuais, dividida pela soma dos graus de liberdade:

$$QM_I = \Sigma SM_I / \Sigma GL_I$$

$$QM_G = \Sigma SM_G / \Sigma GL_G$$

b) Análise entre e dentro de Grupos

A análise de variância frequências gênicas de indivíduos adultos, jovens e plântulas de *C. brasiliense* como uma população baseou-se no modelo matemático:

$$Y_{ijk} = m + f_i + b_{j(i)} + g_{k(ij)}$$

onde :

Y_{ijk} : frequência do gene k, dentro do indivíduos j, dentro do grupo i;

m: média geral da frequência alélica;

f_i = efeito do grupo, com $i = 1, 2, \dots, a$;

$b_{j(i)}$: efeito do indivíduo j, dentro do grupo i, com $j = 1, 2, \dots, b_i$;

$g_{k(ij)}$ = efeito do gene k, dentro do indivíduo j, dentro do grupo i, com $k = 1, 2, \dots, n_{ij}$.

As estimativas dos componentes de variância para os 3 grupos foram obtidas pela decomposição das esperanças dos quadrados médios da análise de variância, conforme Tabela 3, desse modo:

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

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

$$\hat{\sigma}_g^2 = (QM_G - QMi)k_I$$

onde: $\hat{\sigma}_G^2$ = variância entre genes, dentro de indivíduos, dentro de grupos;

$\hat{\sigma}_I^2$ = variância entre indivíduos, dentro de grupos;

$\hat{\sigma}_g^2$ = variância entre grupos de indivíduos.

K_1 =corresponde, ao coeficiente das variâncias entre grupos ($\hat{\sigma}_G^2$) no modelo hierárquico desbalanceado.

Tabela 6: Esquema da análise de variância de frequência alélicas no modelo hierárquico desbalanceado para adultos, jovens e plântulas de *C. brasiliense*, em uma população, considerando a espécie como hermafrodita. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

FV	GL	SQ	QM	E(QM) ¹
Grupos	$\sum_{i=1}^a b_i - a$	SQ_G	QM_G	$\hat{\sigma}_g^2 + 2\hat{\sigma}_l^2 + k_l \hat{\sigma}_G^2$
Indivíduos/Grupos	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} c_{ij} - \sum_{i=1}^a b_i$	SQ_l	QM_l	$\hat{\sigma}_g^2 + 2\hat{\sigma}_l^2$
Genes/Indivíd./Grupos	$n... - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} c_{ij}$	SQ_g	QM_g	$\hat{\sigma}_g^2$
Total	$n... - 1$			

O significado genético dos componentes da variância são definidos abaixo:

$$\hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)(\hat{\theta}_G)$$

$$\hat{\sigma}_l^2 = p(1-p)(\hat{f} - \hat{\theta}_G)$$

$$\hat{\sigma}_g^2 = p(1-p)(1 - \hat{f})$$

$$\hat{\sigma}_l^2 = \hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_l^2 + \hat{\sigma}_g^2 = p(1-p)$$

onde:

p = frequência de um gene em um determinado loco;

$\hat{\theta}_G$ = coeficiente de parentesco ou coancestralidade das plantas dentro dos grupos, ou correlação das frequências alélicas de diferentes plantas dentro dos grupos;

$\hat{f}$ = correlação entre alelos dentro de indivíduos, ou a probabilidade de 2 alelos amostrados aleatoriamente de um indivíduo serem idênticos por descendência.

A estimativa dos coeficientes de coancestralidade podem ser obtidas dos componentes variância por:

$$\hat{\theta}_G = \hat{\sigma}_G^2 / \hat{\sigma}_I^2$$

$$\hat{f} = 1 - (\hat{\sigma}_G^2 / \hat{\sigma}_I^2) = (\hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_I^2) / \hat{\sigma}_I^2$$

As estimativas médias entre locos para os parâmetros $\hat{\theta}_G$ e $\hat{f}$, foram obtidas pela média ponderada dos quadrados médios, da seguinte forma:

$$QM_G = \Sigma SQ_G / \Sigma GL_G$$

$$QM_I = \Sigma SQ_I / \Sigma GL_I$$

$$QM_g = \Sigma SQ_g / \Sigma GL_g$$

3.6.7 Tamanho Efetivo

Para calcular o tamanho efetivo dos grupos de indivíduos de *C. brasiliense* considerou-se a população como sendo dióica e monóica (Marques, 1994).

Considerando *C. brasiliense* como dióica o tamanho efetivo populacional para os 03 grupos de indivíduos foi estimado pelas expressões apresentadas abaixo (Crow & Kimura, 1970). Para esta estimativa, pressupôs que não existiam diferenças nas frequências alélicas entre sexos:

Variância média total populacional para plantas femininas:

$$\hat{\sigma}_{f'}^2 = \frac{\bar{p}(1 - \bar{p})}{2\hat{N}_{ef}} = \frac{\hat{\sigma}_f^2}{N_f} + \frac{\hat{\sigma}_g^2}{2N_f}$$

Variância média total populacional para plantas femininas:

$$\hat{\sigma}_{m'}^2 = \frac{\bar{p}(1 - \bar{p})}{2\hat{N}_{em}} = \frac{\hat{\sigma}_f^2}{N_m} + \frac{\hat{\sigma}_g^2}{2N_m}$$

assim:

$$\hat{\sigma}_{FM}^2 = \hat{\sigma}_f^2 + \hat{\sigma}_m^2 = \frac{\bar{p}(1 - p)}{2N_e}$$

onde:

$$\bar{p}(1 - \bar{p}) = \hat{\sigma}_f^2$$

$\bar{p}$ = frequência alélica média;

$\hat{\sigma}_t^2$ = variância total;

N_f = número de plantas femininas

N_m = número de plantas masculinas

Considerando *C. brasiliense* como hermafrodita, o tamanho efetivo foi estimado pela expressão apresentada por Vencovsky (1992) para plantas monóicas (flores díclinas e hermafroditas), visto que não foi possível separar os sexos.

$$\hat{\sigma}_t^2 = \frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{2\hat{N}_e} = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{m} + \frac{\hat{\sigma}_l^2}{nm} + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{2nm}$$

onde:

n = número de indivíduos

m = número de grupos

Expressões que podem servir como orientação para estratégias de amostragem de germoplasmas, ou mesmo visando coleta de sementes para fins de reflorestamentos, em função da grandeza observada dos componentes da variância. A escolha dos números adequados de m e n deve minimizar a variância média ($\hat{\sigma}_t^2$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos Dados Genéticos

4.1.1 Procedimentos de Eletroforese de Isoenzimas

A partir dos testes preliminares, para definição de um protocolo adequado para estudos isoenzimáticos de *C. brasiliense*, foram escolhidos 08 sistemas isoenzimáticos (Tabela 7).

Nos testes com tampões gel/eletrodo diferentes demonstraram a maior eficiência em relação à separação e definição de bandas e de locos, de forma a interpretá-los. Além disso foi possível a averiguação da diminuição do tempo de corrida. Em relação às espécies estudadas no LARGEA, esse tempo era de 8 a 10 horas (TC e CM) e de 4 horas com tampões TCB e H.

Dados das corridas eletroforéticas:

- . V (Voltagem) inicial no gel: 10V
- . V inicial na fonte: 120 a 170V
- . V final no gel: 18 a 32V
- . V final máxima na fonte: 200 a 350V
- . I (corrente) inicial: 25 a 40 mA
- . I final: 25 a 40 mA
- . Tempo de corrida: 4 horas

Tabela 7. Enzimas, sistema de tampão gel/eletrodo e número de locos observados na determinação do protocolo. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Enzima	Sistema Tampão Gel/ Eletrodo	Nº de locos Observados
6PGDH	H	1
MDH		1
PO		2
SKDH		1
PGI	TCB	1
GOT		3
LAP		2
ACP		3

O protocolo utilizado para *C. brasiliense* foi adaptado de Alfenas *et al.*, 1991 (Anexos). Os sistemas isoenzimáticos que obtiveram boa resolução e possibilidade de interpretação genética em *C. brasiliense*, também foram usados e tiveram resultados positivos em outras espécies vegetais, como por exemplo:

.6Pgdh: (Bawa & O'Malley, 1987; Gandara, 1996; Lepsch-Cunha, 1996)

.Mdh: (Reis, 1996; Lepsch-Cunha, 1996; Marcon, 1988; Gandara, 1996; Schnabel & Hamrick, 1990; Liengsiri *et al.*, 1995; Pérez-Nasser, 1993).

.Prx: (Gandara, 1996; Lepsch-Cunha, 1996).

.Skdh: (Schnabel & Hamrick, 1990; Lepsch-Cunha, 1996).

.Pgi: (Schnabel & Hamrick, 1990; Hill *et al.*, 1978; Pérez-Nasser, 1993; Liengsiri *et al.*, 1995; Gandara, 1996; Lepsch-Cunha, 1996; Reis, 1996).

.Got: (Marcon, 1988; Bawa & O'Malley, 1987; Schnabel & Hamrick, 1990).

.Lap: (Hill *et al.*, 1978; Schnabel & Hamrick, 1990; Pérez-Nasser, 1993; Gandara, 1996; Marcon, 1988; Moraes, 1993; Reis, 1996).

.Acp: (Schnabel & Hamrick, 1990).

4.1.2 Interpretação Genética dos Zimogramas

A interpretação genéticas dos zimogramas obtidos, para os oito sistemas enzimáticos utilizados no presente trabalho, é apresentada esquematicamente na Figura 4. Essas são condizentes com os padrões encontrados no estudo de outras espécies, principalmente no que se refere à estrutura das enzimas, número de locos por sistema enzimático e número de alelos por locos.

Malato Desidrogenase (Mdh)

Este sistema revelou uma zona de atividade formada por um loco polimórfico e multialélico (3 alelos), constituída por uma enzima monomérica.

6- Fosfogluconato desidrogenase (6-Pgdh)

Este sistema apresentou apenas uma zona de atividade, interpretada como um loco polimórfico, com três alelos e enzima monomérica.

Shiquimato Desidrogenase (Skdh)

Esta enzima revelou uma zona de atividade, interpretada como um loco de estrutura monomérica, polimórfica com dois alelos.

Figura 4. Interpretação Genética dos Zimogramas dos Sistemas Enzimáticos Polimórficos Utilizados no Estudo de Plântulas, Jovens e Adultos de uma População de *C. brasiliense* Camb. na Estação Ecológica do Panga (Uberlândia – MG). Piracicaba – SP, ESALQ/USP, 1999.

Peroxidase (Prx)

A peroxidase exibiu duas regiões positivas, sendo uma constituída por um loco polimófico de estrutura monomérica, formada de três alelos e outra constituída por 1 loco monomórfico.

Fosfoglucoase Isomerase (Pgi)

Esta enzima apresentou um loco polimófico, dimérico e dialélico.

Glutamato- Oxalacetato Transminase (Got)

Este sistema apresentou três zonas de atividade, formadas por três locos monomórficos, com um alelo fixado.

Fosfatase Ácida (Acp)

Este sistema também apresentou três zonas de atividade, formadas por três locos monomórficos.

Leucina Aminopeptidase (Lap)

A Leucina aminopeptidase apresentou somente duas zonas de atividade, interpretada como locos polimórficos, com dois alelos cada e estrutura monomérica.

4.2 Análise das Frequências Alélicas dos Grupos

A estimativa da variabilidade genética foi obtida a partir de 22 alelos distribuídos em 14 locos isoenzimáticos (Tabela 8), encontrados nos três grupos de *C. brasiliense*.

As frequências alélicas oscilaram nos locos polimórficos entre os diferentes grupos, de completa fixação, como no caso do alelo 1 dos locos Prx-1, Got-1, Got-2, Got-3, Acp-1, Acp-2, Acp-3 e Lap-1, igualmente nos adultos, jovens e plântulas, até frequências muito baixas, como no caso alelo 2 do loco Prx-1 (0.033 dos adultos), considerados alelos raros.

As maiores frequências alélicas foram, respectivamente, para plântulas, jovens e adultos, do alelo r do loco Mdh-1, alelo p dos locos 6Pgdh-1, Pgi-1 e Lap-2. No loco Prx-2 os alelos mais frequentes foram p nas plântulas e jovens e alelo r nos adultos, no loco Skdh-1 o alelo mais frequente foi o p das plântulas e alelo q dos jovens e adultos.

A fim de verificar se haverá divergência entre as frequências alélicas entre os grupos, utilizou-se a medida de divergência genética entre frequências alélicas F_{ST} de Wright (1965) (Tabela 9). A significância do F_{ST} foi dada por um teste de X^2 de contingência entre as combinações dos grupos (plântulas/jovens, plântulas/adultos, jovens/adultos).

O teste de contingência para verificar se as frequências alélicas (Tabela 8) e as frequências genotípicas (Tabela 10) eram diferentes entre os grupos foi significativo para 5 dos 6 locos polimórficos avaliados, sugerindo que essas diferenças não podem ser atribuídas ao acaso.

Tabela 8. Frequências alélicas para 6 locos isoenzimáticos polimórficos detectados e teste de X^2 de contingência em *C. brasiliense*. (ns: não significativo; *:5%; **: 1%). Piracicaba, ESALQ/USP. 1999.

	Alelos	Plântulas	Jovens	Adultos	X^2	GL
Mdh-1	P	0,200	0,250	0,217	1,32 ns	4
	Q	0,315	0,300	0,233		
	R	0,485	0,450	0,550		
	N	100	30	30		
Prx-1	P	1,000	1,000	1,000	0,00	
	N	100	30	30		
Prx-2	P	0,490	0,733	0,450	15,02 **	4
	Q	0,170	0,083	0,033		
	R	0,340	0,183	0,517		
	N	100	30	30		
6Pgdh-1	P	0,582	0,817	0,563	6,91 *	2
	Q	0,418	0,183	0,438		
	N	100	30	30		
Skdh-1	P	0,583	0,450	0,350	4,55 *	2
	Q	0,462	0,550	0,650		
	N	100	30	30		
Pgi-1	P	0,760	0,600	0,500	10,20 **	2
	Q	0,240	0,400	0,500		
	N	100	30	30		
Got-1	P	1,000	1,000	1,000	0,00	
	N	100	30	30		
Got-2	P	1,000	1,000	1,000	0,00	
	N	100	30	30		
Got-3	P	1,000	1,000	1,000	0,00	
	N	100	30	30		
Acp-1	P	1,000	1,000	1,000	0,00	
	N	100	30	30		
Acp-2	P	1,000	1,000	1,000	0,00	
	N	100	30	30		
Acp-3	P	1,000	1,000	1,000	0,00	
	N	100	30	30		
Lap-1	P	1,000	1,000	1,000	0,00	
	N	100	30	30		
Lap-2	P	0,805	0,867	0,533	11,48 **	2
	q	0,195	0,133	0,467		
	N	100	30	30		
Total de Alelos		22	22	22		

Tabela 9. Estimativa de divergência genética ($\hat{F}_{ST}$) entre Adultos e Jovens, Jovens e Plântulas e Adultos e Plântulas, de *C. brasiliense*, a partir de 8 locos enzimáticos polimórficos. Piracicaba - SP, ESALQ/USP, 1999.

Loco	$\hat{F}_{ST}$ Plântulas/Jovens	$\hat{F}_{ST}$ Jovens/Adultos	$\hat{F}_{ST}$ Plântulas/Adultos
Mdh-1	-0,0076 ns	-0,0052 ns	-0,0020 ns
Prx-2	0,0628 *	0,1517 *	0,0290 *
6Pgdh-1	0,1034 *	0,1280 *	-0,0095 ns
Skdh-1	0,0017 ns	-0,0049 ns	0,0544 *
Pgi-1	0,0466 ns	-0,0092 ns	0,1327 **
Lap-2	-0,0008 ns	0,2145 *	0,1604 *
Média	0,0356(0,020) *	0,0759(0,042) *	0,0543(0,028) *

ns: não significativo; *: 5% ; **: 1% de probabilidade

A divergência genética entre os grupos (Tabela 9) de plântulas/jovens foi significativo, em dois dos seis locos avaliados, e para a média dos locos (0,0346). A divergência entre jovens/adultos foi significativa em três dos seis locos, bem como para a média. O $\hat{F}_{ST}$ entre o grupo de plântulas/adultos foi significativo em quatro dos seis locos, bem como para a média dos locos (0,0543). A divergência entre as frequências alélicas dos grupos foi alta, indicando a presença de deriva genética, e/ou seleção, como coloca Reis (1996). Como discutido anteriormente, possivelmente a causa da divergência entre os grupos seja a deriva genética, dado que a hipótese de seleção só seria sustentada se o grupo de jovens fosse descartado da análise.

Tabela 10. Frequências genotípicas para 6 locos isoenzimáticos polimórficos detectados e teste X^2 de contingência em *C. brasiliense*. (ns: não significativo; *:5%; **: 1%). Piracicaba, ESALQ/USP. 1999.

Loco	Classes	Plântulas	Jovens	Adultos	X^2	GL
Mdh-1	A ₁ A ₁	0,080	0,100	0,100	6,24 ns	10
	A ₁ A ₂	0,130	0,233	0,100		
	A ₁ A ₃	0,110	0,067	0,133		
	A ₂ A ₂	0,050	0,000	0,033		
	A ₂ A ₃	0,400	0,367	0,300		
	A ₃ A ₃	0,230	0,233	0,333		
Prx-2	A ₁ A ₁	0,270	0,533	0,300	23,189 *	10
	A ₁ A ₂	0,150	0,167	0,033		
	A ₁ A ₃	0,290	0,233	0,267		
	A ₂ A ₂	0,050	0,00	0,00		
	A ₂ A ₃	0,090	0,00	0,033		
	A ₃ A ₃	0,150	0,067	0,367		
6Pgdh-1	A ₁ A ₁	0,267	0,667	0,292	16,74 **	4
	A ₁ A ₂	0,612	0,300	0,542		
	A ₂ A ₂	0,112	0,033	0,167		
Skdh-1	A ₁ A ₁	0,337	0,300	0,267	10,61 **	4
	A ₁ A ₂	0,402	0,300	0,167		
	A ₂ A ₂	0,261	0,400	0,567		
Pgi-1	A ₁ A ₁	0,640	0,533	0,433	16,54 **	4
	A ₁ A ₂	0,240	0,133	0,133		
	A ₂ A ₂	0,120	0,333	0,433		
Lap-2	A ₁ A ₁	0,667	0,800	0,400	19,93 **	4
	A ₁ A ₂	0,265	0,133	0,267		
	A ₂ A ₂	0,069	0,067	0,333		

A variação nas frequências alélicas entre os diferentes grupos pode ter várias origens, tais como: migração, mutação, seleção e deriva genética. A migração de indivíduos de outras populações, a partir de sementes, ou através de pólen, poderia facilmente causar alterações nas frequências alélicas dos diferentes grupos. Infelizmente, como não se tem dados genéticos de outras populações potencialmente aptas a troca de genes com em estudo, não é possível testar esta hipótese. Da mesma forma, a presença de mutação também não é possível de ser testada, devido a natureza do delineamento experimental.

No caso da seleção, a detecção de sua presença fere um dos pressupostos básicos dos marcadores bioquímicos (isoenzimas), que sua natureza é neutra, portanto não conferem nenhuma vantagem seletiva. Esta teoria, já há muito tempo vem criando polêmica, sendo que até existem dois grupos de cientistas de opiniões divergentes, os neutralistas e os selecionistas, ou a hipótese do balanceamento e a clássica (Futuyma, 1992). Até este momento, não se sabe exatamente qual dos grupos tem a razão, ou se ela realmente existe. Dessa forma, poderia-se especular, no caso da seleção, dizendo que os locos isoenzimáticos estariam ligados a locos que estão sob forte seleção. A seleção poderia atuar em dois sentidos, a favor de alelos favoráveis ou a favor de combinações genotípicas específicas. A hipótese de seleção para alelos favoráveis só seria satisfeita para os locos *Skdh-1* e *Pgi-1*, nos quais as frequências alélicas na Tabela 8 mostram um aumento gradual da frequência do alelo *q*, da fase de plântula para a fase adulta. Concordantemente, a hipótese de seleção para genótipos específicos seria satisfeita para estes mesmos locos, *Skdh-1* e *Pgi-1*. De acordo com as frequências genotípicas (Tabela 10) desses locos, a seleção estaria atuando em favor dos genótipos homozigotos do tipo A_2A_2 .

Entretanto, este conjunto de dados não permite afirmar com certeza se está ocorrendo seleção, entre a fase de plântula e a fase adulta. Os dados obtidos, de forma geral, sugerem muito mais a presença de deriva genética. A

hipótese de deriva genética, seria explicada para quatro dos seis locos polimórficos avaliados, Mdh-1, Prx-2, 6Pgdh-1 e Lap-2, onde as frequências dos alelos oscilou de grupo para grupo. Por exemplo, o alelo p no loco Mdh-1 aumentou sua frequência de 0,200 no grupo de plântulas para 0,250 no grupo de jovens, vindo a cair para 0,217 no grupo de adultos. Nesse mesmo loco o alelo r baixou sua frequência de 0,485 nas plântulas para 0,450 nos jovens, vindo a subir para 0,550 nos adultos. Outro exemplo, seria o do alelo mais frequente no loco Prx-2; nesse o alelo p foi o mais frequente no grupo de plântulas e jovens e o alelo r no grupo de adultos. Nos locos 6Pgdh-1 e Lap-2, também tem-se fortes evidências de deriva genética entre os grupos, onde o alelo p aumentou sua frequência do grupo de plântulas para jovens, vindo a decrescer para uma frequência próximo a meio no grupo de adultos. A deriva pode ter origem no tamanho amostral utilizado para caracterizar os grupos, ou ser intrínseca à própria natureza da população, devido a eventos casuais, tais como seu histórico de colonização, extinção, predação, emigração, entre outros.

Os resultados mostram que as maiores divergências encontram-se entre a fase de jovem e adultos, a considerar pela magnitude do $\hat{F}_{ST}$. Possivelmente, isso ocorre devido a ser uma fase bem mais longa que a fase entre plântulas e jovens. Indivíduos entre a fase de jovens e adultos estariam mais sujeitos à deriva genética, devido a eventos casuais como, catástrofes ambientais, processos intrínsecos a dinâmica da floresta, como abertura de clareiras, causando a morte de um grande número de indivíduos jovens no subbosque ou permitindo o desenvolvimento de alguns indivíduos, pela maior disponibilidade de luz.

Um outro ponto a ser considerado na hipótese de deriva seria que o número de indivíduos na fase de plântula é maior que o número de indivíduos jovens, que por sua vez é maior que o número de indivíduos adultos. Considerando que a amostragem aqui realizada não respeitou esta “pirâmide

social”, caracterizando os jovens e os adultos com um mesmo tamanho amostral ($N=30$), isso poderia ter causado deriva devido à amostragem ineficiente dos indivíduos jovens. Especulando esta possibilidade e comparando as frequências alélicas apenas entre plântulas e adultos, desprezando-se os jovens, tem-se indicativos da presença de seleção em favor de alelos em todos os locos polimórficos. No loco Mdh-1 os alelos p e r estariam sendo favorecidos, no loco Prx-2 o alelo r seria o favorecido e nos locos 6Pgdh-1, Skdh-1, Pgi-1 e Lap-2 o alelo q seria o favorecido. Da mesma forma, as frequências genóticas na Tabela 9 indicariam que certos genótipos são mais favoráveis ao ambiente ciliar. Por exemplo, nos locos Mdh-1 e Prx-2, os genótipos mais favoráveis seriam os homozigotos do tipo A_1A_1 e A_3A_3 , bem como o heterozigoto de seu cruzamento A_1A_3 , para o loco Mdh-1. Nesse caso parece que a seleção está mais associada ao efeito dos alelos que de sua combinação em si. No loco 6Pgdh-1, ambos os genótipos homozigotos (A_1A_1 , A_2A_2) estariam sendo favorecidos, em detrimento do heterozigoto (A_1A_2). Nos locos Skdh-1, Pgi-2 e Lap-2, o genótipo homozigoto do tipo A_2A_2 parece ser o mais vantajoso, seguido pelo homozigoto A_1A_1 , sendo o heterozigoto desfavorecido.

A hipótese de seleção contra heterozigotos parece, à primeira vista, um tanto incoerente, ainda mais se considerarmos muitos dos trabalhos na literatura que postulam justamente o contrário, seleção em favor de heterozigotos. Sempre se pensa nas vantagens do heterozigoto, que carrega dois alelos diferentes, aumentando a plasticidade genética das espécies. Contudo, dado que o *C. brasiliense* ocorre em um ambiente restrito, a seleção poderia estar ocorrendo favorecendo os alelos ou combinações genóticas mais favoráveis a esse ambiente. Segundo Kimura (1982), mesmo sendo os alelos neutros equivalentes funcionalmente para as espécies sob um grupo de condições ambientais determinadas, é possível que alguns deles possam ser selecionados, quando novas condições ambientais são impostas, ou seja, alelos neutros têm um potencial

latente para a seleção, e mutações neutras podem ser uma matéria prima para a evolução adaptativa. Assim, poderia se pensar que, de modo geral, os genótipos homozigotos estão sendo favorecidos pelo ambiente para o estabelecimento na população. Contudo, deve ter-se em mente que os grupos foram caracterizados geneticamente de forma fragmentada ou não sequencialmente, ou seja, as plântulas não deram origem aos jovens e nem estes aos adultos. Na verdade, uma grande parte das plântulas e dos jovens deve ter sido originado do cruzamento entre os adultos.

A melhor hipótese para a variação nas frequências alélicas entre os grupos seria que os adultos deram origem ao maior número de plântulas, possivelmente com a contribuição do fluxo de genes via pólen, de outras populações. Isto parece ficar mais plausível, quando observa-se na Tabela 10 que as frequências genotípicas dos indivíduos adultos homozigóticos tenderam a ser maior em quase todos os locos, com exceção do locus 6Pgdh-1. Da mesma forma, a frequência genotípica nas plântulas tendeu a apresentar maiores valores para os genótipos heterozigotos. Isto poderia ter ocorrido facilmente do cruzamento entre os indivíduos adultos homozigóticos, resultando em progênes segregantes.

Em resumo, plantas adultas homozigotas divergentes (ex: A_1A_1 , A_2A_2 e A_3A_3) devido possivelmente a um efeito fundador ou à seleção, estariam dando origem a progênes (refletido nas plântulas) heterozigóticas, que possivelmente estariam submetidas a forte seleção natural para o ambiente de galeria (solos hidromórficos).

4.3 Índices de Diversidades Genética

A Tabela 11 mostra que, nos 3 grupos de *C. brasiliense*, as estimativas dos parâmetros de diversidade genética são muito semelhantes entre si e estão em torno das médias das populações de espécies arbóreas já estudadas.

A heterozigosidade observada (H_o) desta população de *C. brasiliense*, considerando todos os locos, foram, respectivamente, para plântulas, jovens e adultos, de $0,191 \pm 0,068$; $0,138 \pm 0,055$ e $0,141 \pm 0,054$. Verifica-se que a maior parte da variabilidade genética se encontra dentro do grupo de plântulas. A diversidade genética ou heterozigosidade esperada (H_e) foi maior que a H_o , mostrando o excesso de homozigoto. Porém, esses valores não são estatisticamente diferentes entre si, a julgar pelo seu erro padrão da média.

Hamrick & Godt (1990), em uma revisão de 653 estudos de diversidade genética por isoenzimas com 449 espécies de plantas, encontraram uma diversidade genética média ao nível populacional de 0,160 para gimnospermas, 0,149 para espécies arbóreas, 0,159 para espécie de ampla distribuição, 0,109 para espécies tropicais, 0,124 para espécies de polinização por animais e 0,123 para espécie com dispersão pelo vento. Pode-se observar que a diversidade genética desta população nas plântulas foi superior às médias de todos estes casos e, nos jovens e adultos, manteve-se um pouco mais baixa quando comparada às médias de espécies arbóreas e de ampla distribuição.

No entanto, valores mais elevados ocorrem em algumas espécies. Em *Bauhinia forficata*, Santos (1994) encontrou o valor de 0,451 para heterozigosidade em uma população natural. Já, Murawski & Bawa (1994) encontraram em *Stemonoporus oblongifolius* uma heterozigosidade média por população de 0,282. Hamrick & Loveless (1989) encontraram para 16 espécies arbóreas tropicais, que ocorrem com alta densidade, uma heterozigosidade média de 0,211, sendo este valor superior ao encontrado em *C. brasiliense*, neste estudo.

Tabela 11: Variabilidade genética de uma população de *C. brasiliense* com base em 14 locos e 8 sistemas enzimáticos (os valores entre parênteses equivalem ao erro padrão da média). Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

	Plântulas	Jovens	Adultos
Tamanho da amostra	100	30	30
Número médio de alelos por loco	1,71 (0,24)	1,57 (0,20)	1,64 (0,20)
Porcentagem de locos polimórficos (0,95)	42,86	42,86	42,86
Heterozigosidade média observada (H_o)	0,191 (0,068)	0,138 (0,055)	0,141 (0,054)
Heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$)	0,208 (0,070)	0,187 (0,065)	0,223 (0,072)

Em espécies de baixas densidades ou raras, que podem apresentar altos índices de autofecundação, os valores de heterozigosidade são menores do que aqueles encontrados em espécies comuns. Hamrick & Murawski (1991) conduziram um estudo com 16 espécies arbóreas tropicais que ocorrem a baixa densidade (de 1 indivíduo a cada 2 ha a 1 indivíduo a cada 10 ha) e obtiveram uma heterozigosidade média de 0,124.

Mesmo não estando fora dos valores de médias observados para espécies comuns, *C. brasiliense* apresenta valores inferiores do que os esperados para a mesma, estando mais próximos das médias encontradas para espécies raras, podendo ser um caso intermediário, ou seja, uma espécie comum em ambiente restrito.

Os valores de porcentagem de locos polimórficos encontrados nas 16 espécies comuns, citadas anteriormente, foram de (77%) e das 16 espécies raras de (42%). *C. brasiliense* apresentou novamente valores semelhantes às espécies raras (42,86%). Mesmo assim, esse polimorfismo não é considerado baixo quando comparado a índices de outras espécies. Comparando-se a magnitude

desse índice ao encontrado para espécies vegetais, 36% (Hamrick *et al.* 1979) e 50% (Hamrick & Godt, 1990), pode-se considerar que a população de *C. brasiliense* apresenta um polimorfismo médio.

O número médio de alelos por loco foi baixo e variou pouco entre plântulas ($1,71 \pm 0,24$), jovens ($1,57 \pm 0,20$) e adultos ($1,64 \pm 0,20$). Para esta estimativa considerou-se todos os locos, monomórficos e polimórficos, e como grande parte dos locos eram monomórficos, o valor estimado apresentou-se baixo. Segundo Nei (1977), esta estatística é muito influenciada pelo tamanho da amostragem genética (número de locos), por isso não é uma boa medida de variabilidade genética para comparação entre amostras de tamanhos diferentes.

Na Tabela 12, observa-se valores de $\hat{f}$ (índice de fixação) para os locos polimórficos de plântulas, jovens e adultos de *C. brasiliense*. Apenas os locos Mdh-1 e 6Pgdh-1 das plântulas e jovens e 6Pgdh-1 dos adultos, o $\hat{f}$ foi negativo indicando excesso de heterozigotos, nos demais locos, os valores de $\hat{f}$ foram altos e positivos, mostrando excesso de homozigotos, ou seja, endogamia.

Tabela 12: Índice de Fixação ($\hat{f}$) para 3 grupos de *C. brasiliense*, locos polimórficos. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

Loco	Plântulas	Jovens	Adultos
Mdh-1	-0,023 ns	-0,034 ns	0,105 ns
Prx-2	0,139 ns	0,051 ns	0,370 *
6pgdh-1	-0,258 *	-0,002 ns	-0,101 ns
Skdh-1	0,191 ns	0,394 *	0,634 **
Pgi-1	0,342 **	0,722 **	0,733 **
Lap-1	0,204 *	0,423 *	0,469 *
Média	0,084(0,159)ns	0,264(0,255)**	0,372(0,241)**

Significância: Bootstrapping sobre locos, 10.000 repetições; ns: não significativo; *: 5%; **: 1%

Com relação à média dos locos, o $\hat{f}$ apresentou valores positivos, sugerindo endogamia. O grupo de indivíduos adultos mostrou-se mais endogâmico que o grupo de jovens e plântulas, respectivamente.

Os valores de $\hat{f}$ mais positivos para adultos do que para plântulas (considerando que essas plântulas sejam as descendentes dos adultos) são diferentes dos normalmente encontrados, pois são contrastantes com outros trabalhos de espécies arbóreas tropicais. Como por exemplo, *Beichmedia pendula* (Murawski & Hamrick, 1991), *Shorea megistophylla* (Murawski *et al.*, 1994), *Astrocaryum mexicanum* (Eguiarte *et al.*, 1992), *Pithecellobion pedicellare* (O'Malley & Bawa, 1987), *Cecropia obtusifolia* (Alvarez-Buylla & Garay, 1994), dentre outros, todas com $\hat{f}$ menores ou negativos nos adultos quando comparados às progênies. No entanto, valores de $\hat{f}$ mais altos para adultos e menores para progênies são raros, já foram apontados em *Couratari guianenses* e *Couratari multiflora* (Lepsch-Cunha, 1996) e em *Trichilia tuberculata* (Murawisk & Hamrick, 1991).

Esses resultados em *C. brasiliense* possivelmente podem ser explicados pelo efeito de estrangulamento e aumento populacional (Nei *et al.*, 1975) concomitante com o modelo de migrantes (Slatkin, 1977), e podem ser consistentes com a seguinte hipótese: a presença de excesso de homozigotos (endogamia) pode ser resultante do processo de fundação, ocorrido ou por redução populacional ou colonização da área por poucos indivíduos (efeito fundador). A eliminação dos homozigotos com o tempo pode estar ocorrendo pelo aumento populacional e pelo fluxo gênico via pólen e sementes a longas distâncias, que restaurariam a diversidade genética.

A alta homozigose encontrada nos indivíduos adultos parece ser devido a área em estudo ser possivelmente nova, em termos de colonização. Este fato pode ser explicado pela presença de espécies como *Talauma ovata*, *Tabebuia*

umbelata e *Tapirira guianensis*, que apresentam síndrome de colonizadoras de áreas novas, estas espécies estão entre as 10 primeiras com maior IVI na área estudada (Schiavini, 1992). A espécie estudada pode estar colonizando o local recentemente, tendo sido fundada por população de indivíduos pequena. Assim sendo, o aumento da heterozigosidade nas plântulas, em relação aos adultos, pode ser explicado pelo aumento de indivíduos advindos de outras áreas, expandindo a floresta. A comparação das estimativas de adultos e plântulas quanto aos índices de fixação indicam que a espécie está adaptada à oscilação populacional, já que os mais jovens contém mais heterozigosidade.

Um outro fator, que pode explicar a maior homozigose nos indivíduos adultos, é o fato da possível ocorrência de seleção de plântulas para o estabelecimento de indivíduos adultos. Esta hipótese pode ser explicada devido à ocorrência de indivíduos adultos de *C. brasiliense*, na área estudada, apenas onde o solo é hidromórfico (saturado de água) a maior parte do ano (Schiavini, 1992).

Sabe-se que as isoenzimas são marcadores neutros que não sofrem seleção, mas possivelmente os genes que estão sofrendo seleção podem estar em locos muito próximos dos locos isoenzimáticos, ou seja, com ligação. O loco que sofre seleção para uma melhor adaptação ao ambiente restrito de estabelecimento da espécie (saturado de água) está levando o loco isoenzimático junto, desta forma, segregando de forma igual. Assim sendo, ao invés de estar sendo selecionados genótipos heterozigotos, estão sendo selecionados os homozigotos, pois estes poderão ser os mais adaptados ao ambiente saturado de água. Homozigotos podem ter valor adaptativo maior que os heterozigotos, isso ocorre quando os homozigotos são adaptados a diferentes meios, mas os heterozigotos a nenhum deles (Futuyma, 1992).

Uma terceira forma de explicar a maior endogamia nos indivíduos adultos é que cruzamentos entre indivíduos homozigotos geram indivíduos heterozigotos, refletido nas plântulas.

Em resumo, os adultos dessa espécie não apresentaram índices de fixação menores que as plântulas, refletindo a ausência da seleção no sentido da eliminação de homozigotos (Lepsch-Cunha, 1996). No entanto, a maioria das outras espécies da florestas tropical, já apontada anteriormente, apresentam redução nos índices de fixação dos adultos com relação às progênies. Os autores em geral sugerem seleção a favor de heterozigotos (Equiarte *et al.*, 1992) e, neste caso, endogamia aumentada deve ser importante no sentido da conservação dessas espécies, podendo ocasionar problemas de depressão endogâmica pelo aumento dos genótipos homozigotos (Lepsch-Cunha, 1996). Podendo estar ocorrendo também o aparecimento de apomixia, sendo que, nesse caso, a agamospermia parece ser uma estratégia populacional para manutenção da variabilidade genética existente. Ela aumenta a proporção dos genótipos já existentes, ou seja, a apomixia facultativa pode conter o efeito da depressão endogâmica e deriva genética através do prolongamento e aumento do número de genótipos e, conseqüentemente, conservar a heterozigosidade advinda da reprodução sexuada (Murawski, 1995).

4.4 Aderência ao Equilíbrio de Hardy – Weinberg

Nas Tabelas 13, 14 e 15 são apresentados os testes de χ^2 para verificação dos desvios das frequências genotípicas observadas, com relação às frequências genotípicas esperadas, sob o modelo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Tabela 13: Verificação da aderência das estimativas encontradas para 6 locos polimórficos ao modelo do Equilíbrio de Hardy – Weinberg, através dos testes do χ^2 para o grupo de plântulas de *C. brasiliense*. Piracicaba - SP, ESALQ/USP, 1999.

Loco	Genótipos	n _o	n _e	χ^2	GL	P
Mdh-1	1 – 1	8	4,00	10,87*	3	0,013
	1 – 2	13	12,6			
	1 – 3	11	19,4			
	2 – 2	5	9,92			
	2 – 3	40	30,55			
	3 – 3	23	23,522			
Prx-2	1	30	26,010	2,09ns	1	0,15
	2	42	49,980			#
	3	28	24,010			
6Pgdh	1	26	32,000	5,38ns	1	0,20
	2	60	48,000			#
	3	12	18,000			
Skdh-1	1 – 1	30	26,633	1,58ns	1	0,21
	1 – 2	39	45,734			
	2 – 2	23	19,633			
Pgi-1	1	65	58,522	11,39**	1	0,001
	2	23	35,955			#
	3	12	5,523			
Lap-2	1 – 1	70	66,423	4,38*	1	0,052
	1 – 2	23	30,155			@
	2 – 2	7	3,422			

n_o – número observado; n_e – número esperado; GL – graus de liberdade; P – probabilidade de ajuste para a distribuição dos χ^2 ; * P.0.05 e **P.0.01; ns – não significativo; @ - P_{FISCHER}; #: Teste agrupado

Tabela 14: Verificação da aderência das estimativas encontradas para 6 locos polimórficos ao modelo do Equilíbrio de Hardy – Weinberg, através dos testes do χ^2 para o grupo de jovens de *C. brasiliense*. Piracicaba - SP, ESALQ/USP, 1999.

Loco	Genótipos ou classes	n_o	n_e	χ^2	GL	P
Mdh-1	1	7	6,075	0,172ns	1	0,678
	2	13	14,850			#
	3	7	9,075			
Prx-2	1	16	16,133	0,00ns	1	1,0
	2	12	11,733			#
	3	2	2,133			
6Pgdh-1	1 – 1	20	20,008	0,00ns	1	1,0
	1 – 2	9	8,983			@
	2 – 2	1	1,008			
Skdh-1	1 – 1	9	6,075	3,54ns	1	0,06
	1 – 2	9	14,850			
	2 – 2	12	9,075			
Pgi-1	1 – 1	16	11,408	10,58**	1	0,00
	1 – 2	4	14,183			@
	2 – 2	10	4,408			
Lap-2	1 – 1	24	22,533	2,65ns	1	0,058
	1 – 2	4	6,933			@
	2 – 2	2	0,533			

n_o – número observado; n_e – número esperado; GL – graus de liberdade;

P – probabilidade de ajuste para a distribuição dos χ^2 ; * P.0.05 e **P.0.01

ns – não significativo; @ - P_{FISCHER}; #: Teste agrupado

Em alguns locos de plântulas, jovens e adultos, foi considerado mais seguro o uso do teste exato de Fisher para testar os desvios do EHW, como nos locos Prx-2, 6Pgdh-1 e Pgi-1 das plântulas, Mdh-1 e Prx-2 dos jovens e Mdh-1 e Prx-2 dos adultos, devido à ocorrência de classes com valores inferiores a 5.

Nas plântulas, 3 locos (Mdh-1, Pgi-1 e Lap-2) rejeitaram a hipótese nula e 3 locos (Prx-2, 6pgdh-1 e Skdh-1) apresentaram-se nas proporções do EHW. Para os indivíduos jovens, 5 locos (Mdh-1, Prx-2, 6pgdh-1, Skdh-1 e Lap-2) apresentaram-se em EHW pelo teste do χ^2 e 1 rejeitou a hipótese nula (Pgi-1). Para os indivíduos adultos, a hipótese nula de adequação ao modelo do EHW foi rejeitada em 3 locos (Skdh-1, Pgi-1 e Lap-2) e 3 apresentaram-se em EHW (Mdh-1, Prx-2 e 6pgdh).

Desvios do EHW podem estar associados a fatores, como deriva genética, seleção, mutação ou tamanho finito da população e não propriamente ao sistema reprodutivo/endogamia (Sebbenn, 1997). Desta forma, é importante testar se os locos que não se adequaram ao modelo proposto por Hardy– Weinberg estão em equilíbrio de endogamia de Wright (EEW), o qual separa a endogamia, devido ao sistema misto de reprodução, do efeito de outros fatores não ligados ao sistema reprodutivo. A adequação dos dados ao modelo de Wright pressupõe endogamia gerada por autofecundação e/ou acasalamentos entre aparentados (Sebbenn, 1997).

Apenas o loco Mdh-1 nas plântulas (Tabela 16) pode ser submetido ao teste de endogamia de Wright (EEW). Os demais locos que não se apresentaram em EHW, não puderam ser testados quanto à adequação ao modelo do EEW, devido aos graus de liberdade terem sido insuficientes para a realização do teste.

Tabela 15: Verificação da aderência das estimativas encontradas para 6 locos polimórficos ao modelo do Equilíbrio de Hardy – Weinberg, através dos testes do χ^2 para o grupo de adultos de *C. brasiliense*. Piracicaba - SP, ESALQ/USP, 1999.

Loco	Genótipos ou classe	N _o	n _e	χ^2	GL	P
Mdh	1	10	9,075	0,172ns	1	0,678
	2	13	14,850			#
	3	7	6,075			
Prx-2	1	10	8,008	3,668ns	1	0,055
	2	10	14,983			#
	3	10	7,008			
6Pgdh	1 – 1	7	7,594	0,043ns	1	0,836
	1 – 2	13	11,813			
	2 – 2	4	4,594			
Skdh	1 – 1	8	3,675	10,00**	1	0,001
	1 – 2	5	13,650			@
	2 – 2	17	12,675			
Pgi	1 – 1	13	7,500	14,02**	1	0,0
	1 – 2	4	15,000			@
	2 – 2	13	7,500			
Lap-2	1 – 1	12	8,533	5,15*	1	0,023
	1 – 2	8	14,933			
	2 – 2	10	6,533			

n_o – número observado; n_e – número esperado; GL – graus de liberdade;

P – probabilidade de ajuste para a distribuição dos χ^2 ; * P,0.05 e **P,0.01

ns – não significativo; @ - P_{FISCHER}; #: Teste agrupado

Tabela 16: Teste de equilíbrio de endogamia de Wright (EEW), para o loco Mdh-1 de plântulas de *C. brasiliense*. ESALQ/USP, 1999.

Classe	no	Ne	χ^2
A1A1	8	4,1	3,78
A1A2	13	11,7	0,15
A1A3	11	14,2	1,58
A2A2	5	16,0	5,93
A2A3	40	31,3	2,44
A3A3	23	22,8	0,00
	100	100	13,89 **
			GL = 2

** significativo a 1% de probabilidade.

4.5 Tamanho Efetivo ($\hat{N}_e$)

O tamanho efetivo para os grupos foi calculado considerando as espécie como hermafroditas e dióicas. Partindo do princípio que as frequências alélicas não são diferentes entre machos e fêmeas (proporção de 1:1), não existem diferenças entre as estimativas de $\hat{N}_e$ como dióicas e hermafroditas. Assim sendo, serão apresentados na Tabela 17 apenas os resultados que consideram *C. brasiliense* como hermafroditas, já que os resultados que consideram a espécie como sendo dióica serão os mesmos. Os cálculos foram baseados na metodologia proposta por Vencovsky (1992), para plantas hermafroditas.

Tabela 17: Componentes de variâncias a nível de média de locos para todos os Grupos, Plântulas, Jovens e Adultos, e $\hat{N}_e$, $\hat{N}_e\%$ e $\hat{f}$. Considerando *C. brasiliense* como hermafrodita. Piracicaba- SP, ESALQ/USP. 1999.

	Todos os Grupos			Plântulas			Jovens			Adultos		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
$\hat{\sigma}_g^2$	2,4000	320	0,0075	—						—		
$\hat{\sigma}_{I/G}^2$	0,5027	160	0,0031	2,6744	200	0,0134	1,9333	60	0,0322	1,9750	60	0,0329
$\hat{\sigma}_G^2$	0,1528	3	0,0509	0,2452	100	0,0025	0,6943	30	0,0231	1,1693	30	0,0390
$\hat{\sigma}_T^2$	3,0555		0,0616	2,9196		0,0158	2,6276		0,0554	3,1443		0,0719
N			160			100			30			30
$\hat{N}_e$			24,8			92,2			23,7			21,9
$\hat{N}_e$ (%)			15,50			92,25			79,10			72,89
$\hat{f}$			0,173			0,082			0,239			0,377

$\hat{\sigma}_g^2$ = componentes de variâncias entre genes; $\hat{\sigma}_{I/G}^2$ = componentes entre variâncias de indivíduos /grupos;

$\hat{\sigma}_G^2$ = componentes de variância de grupos; $\hat{\sigma}_T^2$ = componentes total de variância de indivíduos: A= estimativa de componentes de variância; B= número de indivíduos; C= A/B= variância média de cada componente.

A partir da estimativa de $\hat{N}_e$ para todos os grupos, plântulas, jovens e adultos (Tabela 17), pode-se afirmar que, no conjunto, os 160 indivíduos (N) analisados representam em média geneticamente 24,8 indivíduos que poderiam estar se acasalando (se todos os indivíduos fossem adultos reprodutivos). Nas plântulas 100 indivíduos analisados representam geneticamente 92,25 indivíduos que poderiam estar se acasalando (se fossem adultos reprodutivos), nos jovens 30 indivíduos analisados representam geneticamente 23,73 indivíduos que poderiam

estar acasalando e nos adultos 30 indivíduos analisados representam geneticamente 21,87 indivíduos que estão se acasalando.

Como o $\hat{N}_e$ foi aqui diferente possivelmente em função de deriva genética, poderia-se interpretar este resultado, ainda como, que os 160 indivíduos avaliados na população representam aproximadamente 25 plantas de uma população infinita que esteja sofrendo a mesma quantidade de deriva genética.

Da mesma forma, significa que as 100 plântulas, os 30 jovens e os 30 adultos representam 92, 23 e 22 indivíduos de uma população infinita que apresenta a mesma deriva genética. Verifica-se, assim, que a representatividade genética dos grupos é próxima daquelas que poderiam ser obtidas em uma população panmítica, e, portanto, que a deriva genética é baixa, podendo, as variações nas freqüências alélicas serem atribuídas mais ao sistema reprodutivo, como pode ser observado pelo índice de fixação, ou seja, quanto maior o f menor é a representatividade. No caso da análise da população, considerando todos os grupos conjuntamente, a baixa representatividade estaria associada à deriva genética amostral entre os grupos. Isto é confirmado pela superioridade na $\hat{\sigma}_G^2$ média (Coluna C) a qual foi o componente que contribuiu mais para a $\hat{\sigma}_T^2$.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que quanto maior a endogamia, menor é a representatividade em relação ao tamanho efetivo. O tamanho efetivo é reduzido quando existe deriva, cruzamento entre aparentados e endogamia como observado em *C. brasiliense*.

Se for feita uma simulação mudando as proporções sexuais de 1:1 para 1:2 e 1:3, os resultados obtidos serão diferentes para dióica a estimativa de espécies como quando comparada a hermafrodita (Tabela 18). Verifica-se que o tamanho efetivo é otimizado quando a proporção sexual é 1:1, sendo que quanto maior a diferença entre esta proporção, menor será o tamanho efetivo.

O tamanho efetivo populacional é um parâmetro muito importante a ser conhecido nas atividades de preservação de germoplasma, coleta de sementes e conservação *in situ*, uma vez que trata da representatividade genética das amostras.

Tabela 18. Simulação do tamanho efetivo de *C. brasiliense*, considerando as proporções sexuais de machos (M) e fêmeas (F) diferentes [1 macho para 1 fêmea (1:1), 1 macho para 2 fêmeas (1:2) e 1 macho para 3 fêmeas (1:3)]. Piracicaba- SP, ESALQ/USP, 1999.

	1:1						1:2						1:3					
	Plântula		Jovens		Adultos		Plântula		Jovens		Adultos		Plântula		Jovens		Adultos	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
N	50	50	15	15	15	15	50	100	15	30	15	30	50	150	14	45	15	45
$\hat{N}_c$	92.25		23.73		21.87		123.00		31.64		29.16		138.38		35.60		32.80	
$\hat{N}_c$ (%)	92.25		79.10		72.89		82.00		70.31		64.79		69.19		59.33		54.67	

Nas atividades de coleta de sementes de plantas alógamas, o conhecimento do tamanho efetivo é tão importante, não sendo suficiente coletar centenas ou milhares de sementes de apenas uma única planta, porque elas não valerão mais do que quatro sementes colhidas de quatro plantas diferentes. Por conseguinte, para esta atividade, o conhecimento do $\hat{N}$ é fundamental para delinear as estratégias ótimas de coleta (Vencovsky, 1987).

Vencovsky (1987) sugere, para aumentar o $\hat{N}$, tanto para coleta de sementes como para a preservação de germoplasma, que se processe o controle gamético feminino através da colheita de um número igual de sementes de cada planta. Esta prática resulta em um tamanho efetivo maior, uma vez que todas as plantas contribuirão com número igual de gametas femininos, não havendo risco

de umas contribuírem com mais ou menos sementes, como ocorre quando essas são tomadas ao acaso. Tal prática reduz o efeito da deriva genética ou, em termos quantitativos, reduz a variância do número de gametas fornecidos pelas plantas genitoras, aumentando o $\hat{N}$ ou, em outros termos, a representatividade genética do material. Nessa técnica de coleta de campo, o tamanho efetivo máximo atingível é de $4M$, sendo M o número de plantas genitoras. Ainda segundo o autor, o que se deve tomar aleatoriamente é o conjunto de plantas genitoras e não suas sementes. Logo, na atividade de coleta de sementes, o ideal é que se procure sempre reunir descendentes, como sementes, de um maior número possível de plantas genitoras e de preferência um número igual, ou aproximadamente igual, de sementes de cada uma. A recuperação de áreas degradadas com sementes coletadas a partir destes princípios dará origem a populações com alto potencial evolutivo, dada a possibilidade de infinitas novas recombinações genotípicas que, por sua vez, aumentarão a adaptabilidade da espécie ao ambiente, a possíveis mudanças ambientais futura e à colonização de novas áreas.

Com relação à conservação *in situ*, observou-se para *C. brasiliense* que, mesmo com alta endogamia, a espécie apresenta com potencial para esse tipo de conservação. Isso porque obter-se a área mínima viável para conservação *in situ* a longo prazo seriam necessários 500 indivíduos (com cruzamentos aleatórios, iguais proporções de indivíduos de ambos os sexos, sem flutuações na populações, sem sobreposição de geração e distribuição aleatória das famílias) e a curto prazo 50 indivíduos, o número mínimo para essa prática (Frankel & Suolé, 1981). Sendo a relação $\hat{N}/N$ da população estudada igual a 0,729 ($\hat{N} = 21,87$ tamanho efetivo de adultos e $N = 30$ adultos amostrados), o número médio de plantas por hectare de 230 indivíduos (Schiavini, 1992) e essa multiplicação obtêm-se 167,67 indivíduos diferentes em 1 ha, supõe-se que teoricamente esta espécie poderá ser conservada dentro de uma área de mais ou menos 5 ha (838

indivíduos diferentes que se acasalam), sem que ocorra perda de alelos raros a médio prazo.

Para a conservação de *C. brasiliense*, podemos considerar a estruturação de poucas reservas, mas relativamente grandes. A sugestão de reservas grandes está especialmente relacionada à possibilidade de presença contínua da fauna associada à espécie, pois a manutenção da elevação de heterozigosidade depende da manutenção da fauna como elemento imprescindível na movimentação dos alelos (realização de cruzamentos, fluxo de pólen e dispersão de propágulos), uma vez que a alta densidade da espécie implica numa disponibilidade de grande número de indivíduos em áreas relativamente pequenas. Isto é devido à capacidade de conservar a variabilidade genética dentro da população ao longo do tempo, à intensa regeneração da espécie e ao aumento da diversidade genética nas plântulas.

Tal resultado decorre da alta densidade de indivíduos na população e mostra que, para o caso da conservação de ecossistemas florestais, o ideal é que a estimativa da área mínima viável seja realizada a partir das espécies raras (menos que 4 indivíduos por hectare), visto que estas requerem muito mais indivíduos para sua manutenção (Hamrick & Murawski, 1991). Utilizando-se espécies raras na determinação da área mínima viável para a conservação, um grande número de espécies comuns, como *C. brasiliense*, serão preservadas indiretamente, visto que estas requerem menos área para sua manutenção.

5. CONCLUSÕES

O estudo genético da população de *C. brasiliense* permitiu as seguintes conclusões:

- Detectou-se diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre os diferentes grupos amostrados, entretanto os dados não permitem concluir com precisão se os desvios são devido ao sistema reprodutivo ou devido a fatores evolutivos.
- O teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg não evidenciou diferenças entre os padrões encontrados dos esperados nos 3 grupos.
- A diversidade genética encontrada dentro dos três grupos de indivíduos *C. brasiliense* está em torno da média das populações de espécies arbóreas já estudadas. A maior parte da variabilidade genética se encontra dentro das plântulas. Os valores obtidos de heterozigosidade observada para esta espécie, em geral, foram menores que aqueles já encontrados para espécies comuns.
- A análise dos níveis de fixação alélica mostraram a presença de endogamia em todos os grupos, sendo menos pronunciada nas plântulas. A comparação dessas estimativas entre plântulas, jovens e adultos indicam que a espécie pode ter colonizado a área recentemente, ou então os indivíduos adultos homozigotos estão mais adaptados ao estabelecimento em áreas alagadas. Desta forma estaria ocorrendo seleção contra heterozigotos.

- A análise do tamanho efetivo revelou que quanto maior é o índice de fixação e a diferença na proporção entre sexos, menor é a representatividade genética nos grupos.
- Os resultados gerais indicam que na área de estudo existe a capacidade de conservar a variabilidade genética dentro da população ao longo do tempo, já que a espécie apresenta intensa regeneração, com alta diversidade genética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIESP (ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO).
Glossário de ecologia. São Paulo. 1987. 271p.

AGREN, J. & ZACKRISSON, O. Age and size struture of *Pinus sylvestris* populations on mires in central northern Sweden. **Journal of Ecology**, v.78, p.1049-1062, 1990.

AIDAR, M. P. M. Ecologia do aribá (*Centrolobium tomentosum* Guill. Ex Benth.- Fabaceae) e o ecótono mata ciliar da bacia do rio Jacaré Pepira, Campinas, 1992. Dissertação (M.S.) – Ecologia, UNICAMP.

ALBUQUERQUE, J.M. **Identificação e germinação de sementes amazônicas**. FCAP. Serviço do Documento e informação. 1993. p.54-55.

ALFENAS, S.A.; PETER, I.P.; BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e fungos em essências florestais**. UFV, Viçosa- MG. 1991. 242p.

ALVAREZ-BUYLLA, E. & GARAY, A.A. Population genetic struture of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pionner tree species. **Evolution**, v.48, n.2, p.437-453, 1994.

- BAWA, K.S. & O'MALLEY, D.M. Estudios genéticos y de sistemas de cruzamiento en algunas arbóreas de bosques tropicales. **Rev. biol. trop.**, v.35, n.1, p. 177-188, 1987.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Vol. 1. Editora LTC/Edusp. 1978.
- BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M.; APSIT, V.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. **Their. Appl. Genet.**, v.76, p. 923-928, 1988.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras recomendadas silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. CNPFlorestas. EMBRAPA. Brasília. 1994. 124p.
- 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.
- CONNELL, J.H. On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. In: DEN BOER, P. J. & GRADWELL, G.R. (Ed.) **Dynamics of numbers in populations**. Center for Agricultural publication and Documentation, Wageningen, Netherlands. 1971. 298-312p.

CROW, J.F. & KIMURA, M. A. **An Introduction to Population Genetics Theory**. HARPER & ROW, PUBLISHERS. 1970. 591 p.

DAUBENMIRE, R. Phenology and other characteristics of tropical semi-deciduous forest in north-western Costa Rica. **Journal of Ecology**, v.60, n.1, p. 147-170, 1972.

DIAS, L.A. dos S. & KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. **Agrotrópica**, v.3, n.3, p.119-127.1991

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

FISCHER, E. A . 1990. Distribuição de frequência de classes de tamanho e estratégia reprodutiva de *Calophyllum brasiliense* Camb. (GUTTIFERAE) em mata ciliar na Estação Ecológica Estadual Juréia- Itatins, São Paulo. In: **Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste brasileira**. Vol II. pp. 337-347.

FRANKEL, O. H. & SOULÉ, M.S. **Conservation and Evolution**. Cambridge University Press. Cambridge. 1981. 327 p.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 621 p.

GANDARA, F. B. Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Campinas, 1996. Dissertação (M.S.) - UNICAMP.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba, USP/ESALQ. 13^o ed. 1990. 354p.

HAMRICK, J. L. & GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, AHD; Clegg, M. T.; Kahler, A L. e Weir, B. S. (Ed.) **Plant population genetic resourcer**. Genetic Resources. Sinauer. Sunderland, Massachusetts. 1990. p.43 - 63.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B. & MITTON. Levels of genetic variation in trees: Influence of Life history characteristics. In: MT CONKLE (tech coord.) Pranc. Symp. **On Isoenzymes of North american Forest Insects**. USDA For Service ,Gen. Tech Report PSW-48. Barkley. 1979. p 35-41.

HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v.18, p.201-207, 1986.

HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: association with reproductive biology. In: BOCK, J.H. & LINHART, Y.B. (Ed.) **The Evolutionary Ecology of Plants**. Westview Press, Boulder, CO, USA. 1989. p.129-146.

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. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: **Differentiation patterns in higher plants**. Copyright by Academic Press. 1987. p. 53-67.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural forest population. In: SHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBIDE, B. & THOMAS, W.L. (Ed.) **Genetic and Conservation**. New York, The Benjamin/Cummings Publishing CO. 1983. p. 335-48.

HAMRICK, J. L. Distribution of genetic variation within and among natural forest population. In, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBIDE, B. & THOMAS, W.L. (Ed.) **Shonewald-cox** 1982.

HETT, J. & LOUCKS, O. L. Age structure models of balsam fir and eastern hemlock. **Journal of Ecology**, v.64, p.1029-1044, 1976.

HILL, R.J.; PRANCE, G.T.; MORI, S.A.; STEWARD, W.C.; SHIMABUKURU, D. & BERNARDI, J. Estudo eletroforético da dinâmica da variação genética entre taxa ribeirinhas ao longo do Rio Solimões, América do Sul. **ACTA AMAZONICA**, v.8, n.2, p.183-99, 1978.

JANSEN, D. H. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. **American Naturalist**. v.940, n.104, p.501-528, 1970.

JOLY, C. Heterogeneidade ambiental e diversidade de estratégias de adaptações de espécies arbóreas de mata de galeria. In: X Simpósio anual da ACIESP, 1986. **Anais**. p.50.

KAGEYAMA, P.Y. Estudo para implantação de matas de galeria na bacia hidrográfica do Passa Cinco visando a utilização para abastecimento público. Piracicaba. ESALQ/USP. **Relatório de Pesquisa**. 236p. 1986.

KAGEYAMA, P.Y. 1987. Conservação *In Situ* de recursos genéticos de plantas. **IPEF**. Piracicaba.(35): pp. 7-37.

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, Campinas- SP. 1989. **Anais**. Fundação Cargill,. p.130-43.

KAGEYAMA, P.Y. Genetic struture of tropical tree species of Brasil. In: BAWA, K.S.; HADLEY, M. (Ed.) **Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants**. (Man and the Biosphere, 7). UNESCO and Partheno Publishingg. 1990. p.3383-394.

KAWAGUICI, C.B. Germinação de sementes, estrutura e sobrevivência de uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb. (CLUSIACEAE) em mata de galeria da Estação Ecológica do Panga. Uberlândia, 1994. Monografia de Graduação - Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Uberlândia.

KIMURA, M. The neutral theory as a basis for understanding the mechanism of evolution and variation at the molecular level. In: KIMURA, M. ed **Molecular Evolution, Protein Polymorphism and the Neutral Theory**. Cap. 1. Tokyo and Berlin, Japan Scientific Societies and Springer-Verlag, p. 3-56. 1982.

- KNOWLES, P. & GRANT, M. Age and size struture analyses of engelmann spruce, ponderosa pine, and limber pine in Colorado. **Ecology**, v. 64, n.1, p. 1-9, 1983.
- LEITE, A. M. C.; RANKIN, J. M. & LLERAS, E. Ecologia de plântulas de *Pithecolobium racemosum* Ducke. 2 – O comportamento populacional de plântulas. **Acta amazônica**, v.12, n.3, p.529-548, 1982.
- LEITE, A. M. C. & SALOMÃO, A. N. Estrutura populacional de regenerantes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em mata ciliar do Distrito Federal. **Acta botânica brasileira**, v.6, n.1, p.123-134, 1992.
- LEPSCH-CUNHA, N. Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia Central. Piracicaba, 1996. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LEWIS,P.O. & ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic date**. Version 1.0 (d12), 1999.
- LIEBERG, S. A. Tolerância à inundação e aspectos demográficos de *Inga affinis* D. C. Campinas, 1990. Dissertação (M.S.) – Ecologa, UNICAMP.
- LIENGSI, C.; YEH, F.C. & BOYLE, T. J.B. Isozyme analysis of a forest tree, *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. in Thailand. In: **Forest Ecology and Managment**, v.74, p.13-22, 1995.

- LIMA, W. P. Função hidrológica da mata ciliar. IN: Simpósio sobre mata ciliar, 1989. **Anais**, L. M. BARBOSA ed. Fundação Cargil. p. 25-42.
- LOBO, P.C. Tolerância à inundação de plantas de *Talauma ovata* ST.Hill. e aspectos do seu comportamento em uma mata ciliar da bacia do Rio Jacaré- Pepira, Brotas, SP. Campinas, 1993. Dissertação (M.S.) - Biologia Vegetal, UNICAMP.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Editora Plantarum LTDA. Nova Odessa, SP. 1992. 116p.
- LOVELESS, M. D., & HAMRICK, J.L. Distribucion de la variacion en espécies de arbolés tropicales. **Revista Biologia Tropicales**, v.35, p.165-75. 1987. Suplemento, 1.
- MALTEZ, H. M. Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. – Apocynaceae (Peroba rosa) em uma floresta estacional semidecídua no Estado de São Paulo. Campinas, 1997. 132p. Dissertação (M.S.) - Instituto de Biologia, UNICAMP.
- MANTOVANI, W. Conceituação e fatores condicionantes. In: Simpósio sobre mata ciliar, Campinas, SP, 1989. **Anais**. BARBOSA, L. M. (Ed.) Fundação Cargill. Campinas, SP, 1989. p.120-129.
- MANTOVANI, W.; ROSSI, L.; ROMANIUC NETO, S. ASSAD-LUDWIS, I. Y.; WANDERLEY, M. G.; MELO, M. M. R. S & TOLEDO, C. B. Estudos Fitossociológicos de área de mata ciliar em Mogi- Guaçu, SP, Brasil. In:

Simpósio sobre mata ciliar, 1989. **Anais.** L. M. BARBOSA (Ed) Fundação Cargil. p.235-267.

MARCON, G. Estrutura genética de populações de *Stylosantes humilis* H. B. K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do estado do Pernambuco. Piracicaba, 1988. 179p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MARQUES, M.C.M. Estudos auto-ecológicos do guanandi (*Calophyllum brasiliense* Camb. CLUSIACEAE) em mata ciliar no município de Brotas, SP. Campinas, 1994. Dissertação (M.S.) - Biologia vegetal, UNICAMP.

MARTINS, F.R. **Estrutura de uma floresta mesófila.** Campinas: Editora da UNICAMP. 1991. 246p.

MORAES, M. L. T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* F. F. & M. F. Allemão- ANARCADIACEAE (syn: *Astronium urundeuva* FR Allemão Engle). Piracicaba, 1993. 153p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MOREIRA , A.G. Aspectos demográficos de *Emmotum nitens* (Benth.) Miers (Icacinaceae) em um cerradão distrófico no Distrito Federal. Campinas, 1987. Dissertação (M.S.) - Biologia Vegetal, UNICAMP.

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.

MURAWSKI, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from a canopy perspective. In: Lawman, M.D. & Nadkarmi, N.M. **Forest Canopies**. Academic Press. 1995. p. 457-493.

MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. The effect of density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v.67, p.167-174, 1991.

MURAWSKI, D. A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forests. **Biotropica**, v.26, p.23-29, 1994.

NEI, M. F- Statistic and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. human genetics**, v.41, p.225-33, 1971.

NEI, M. Molecular population genetics and evolution . In: NEUBERGER, A. & TATUM, E.L., (Ed.) **Frontiers of Biology**. Elsevier, New York. 1975. V. 40.

NILSSON, C. Conservation management of riparian communities. In: HANSSON, L. (Ed.) **Ecological principles of nature conservation**. Elsevier applied Science. London. 1992.

NILSSON, C.; GRELSSON, G.; JOHANSSON, M. & SPERENS, U. Can rarity and diversity be predicted in vegetation along river banks? **Biological conservation**, v.44, p.201-212, 1988.

- OLIVEIRA, P. E. A.; RIBEIRO, J. F. & GONZALES, M. I. Estrutura e distribuição espacial de uma população de *Kielmeyera coriaceae* Mart. de cerrados de Brasília . **Revista Brasileira de Botânica**, v.12, p.39-47, 1989.
- O'MALLEY, D. M. & BAWA, K. A. Matyng system of a tropical rain forest tree species. **Americam Journal of Botany**, v.74, n.8, p.1143-49, 1987.
- PÉREZ-NASSER, N.; EQUIARTE, L.E. & PIÑERO, D. Mating system and genetic struture of the distylous tropical tree *Psychotria Faxlucens* (RUBIACEA). **Americam Journal of Botany**, v.80, n.1, p.45-52, 1993.
- PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis no brasil e das exóticas cultivadas**. Vol. III. Ministério da Agricultura, IBDF. Rio de Janeiro. 1931. p.534-536.
- RAMIREZ, N. & ARROYO, M.K. Estructura poblacional de *Copaifera publiflora* Benth. (Leguminosae; Caesalpinioideae) en los altos llanos centrales de Venezuela. **Biotropica**, v.22, n.2, p.124-132, 1990.
- REIS, M.S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* MARTIUS). Piracicaba, 1996. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M. & REIS, A. Projeto madeira de Santa Catarina. **Sellowia**. p. 320, 1978.

- RESENDE, J.C.F. Ecologia de população de *Copaifera langsdorffii* em mata de galeria na Estação Ecológica do Panga (Uberlândia, MG). Brasília, 1997. 60p. Dissertação (M.S.) – Ecologia, Universidade de Brasília.
- RESENDE, J.C.F. Estrutura, crescimento e sobrevivência de uma população de *Copailera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae) em mata de galeria no Triângulo Mineiro. Uberlândia, 1994. Monografia (Graduação) - Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia.
- RIBEIRO , J.F. & SCHIAVINI. I. Recuperação de matas de galeria: integração entre a oferta ambiental e a biologia das espécies. In: Ribeiro, J.F. (Ed) **Cerrado: Matas de Galeria..** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 164p.
- RODRIGUES, R.R. Análise estrutural das formações ripárias. In: Simpósio Sobre Mata Ciliar, 1989. **Anais.** B. BARBOSA, L. M. ed. Fundação Cargil. p.99-119.
- RODRIGUES, R. R. Análise de um remanescente de vegetação natural às margens do rio Passa Cinco, Ipeúma, SP. Campinas, 1992. Tese (Doutorado) - Biologia vegetal, UNICAMP.
- SANTOS, E.M.G. Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpiniaceae). Piracicaba, 1994. 114p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- SCHIAVINI, I. Estrutura das Comunidades de mata de galeria da Estação Ecológica do Panga (Uberlândia-MG). Campinas, 1992. Tese (Doutorado)-Ecologia, UNICAMP.
- SCHIAVINI, I. & ARAUJO, G.M. Considerações sobre a vegetação da Reserva Ecológica do Panga (Uberlândia-MG). **Sociedade e Natureza**, v.1, p. 61-66, 1989.
- SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas**. Editora Sarvier. São Paulo, SP. 1979. 150p.
- SCHNABEL, A.; HAMRICK, J.L. Comparative analysis of population genetic structure in *Quercus macrocarpa* and *Q. gambelii* (Fagaceae). IN: **Systematic Botany**, v.15, n.2, p.240-251,1990.
- SEBBENN, A.M. Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas. Piracicaba, 1997. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SILVA, D.M. Estrutura de tamanho e padrão espacial de uma população de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) em mata mesófila semidecídua no município de Campinas, SP. Campinas, 1991. Dissertação (M.S.) - Biologia Vegetal, UNICAMP.
- SILVERTON, J.W. **Introduction to plant population ecology**. Longman ed. London. 1987. 229p.

- SLATKIN, M. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. **Theoret. Popul. Biol.**, v. 12, p.253-62, 1977.
- SOLBRIG, O. T. Studies on the population biology of the genus *Viola*. II. The effect of plant-size on fitness in *Viola sororia*. **Evolution**, v.35, n.6, p.1080-1093, 1981.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C. & GASTONY, G.L. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**. v.73, n.1, p.9-26. 1983.
- STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M. & SMITH, J.S.C. **Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoreses of enzymes from maize (*Zea mays* L.)**. Technical Bulletin 286, North Caroline State University, Raleigh, North Caroline. 1988. .87p.
- SWOFFORD, D. L. & SELANDER. **Byosys-2. A Computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics**. University of Illinois at Urbana-Champaign Urbana, Illinois 60801, USA.1997.
- TROPPIER, H. & MACHADO, M.L.A. Variação da estrutura da mata de galeria na bacia do rio Corumbataí (SP) , em relação à água do solo, do tipo de margem e do traçado do rio. **Biogeografia**, v.8, p.1-28, 1974.
- VENCOSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.3, p.349-51, 1994.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. In: **Congresso Latino Americano de Genética**, 10^o, Rio de Janeiro, Proceedings, **Revista Brasileira de Genética**, v.15, p.53-60, 1992. (suplemento 1).

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasmas de espécies alógamas. **IPEF**, Piracicaba, v.35, 1987.

WEBB, L.J.; TRACEY, J.G. & WILLIAMS, W.T. Regeneration and pattern in the subtropical rain forest. **Journal of Ecology**. v.60, p.675-695, 1972.

WEINER, J. Size hierarchies in experimental populations of annual plants. **Ecology**, v.66, n.3, p.743-752, 1985.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data**. North Carolina State University, Sinauer Associates Inc. Pub., Sunderland, Massachusetts. 1990. 377p.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II** Ed. Sinauer, Massachusetts. 2nd ed. 1996. 445p.

WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, n.6, p.1358-1370, 1984.

WENDEL, J. F. e WEEDEN, N. F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.F. e SOLTIS, P.S. (Ed.). **Isozymes in plant biology**. Portland, Dioscorides Press. 1989. p.5-45.

WORKMAN, P. & NISWANDER, J.L. Population studies on southwestern indian tribes. II. Local Genetic differentiation in the Papago. **American journal human genetic**, p.2224-49, 1970.

WRIGHT, S. The interpretation of population struture by F- statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420, 1965.

ANEXOS

1- Relação das medidas dos indivíduos de *Calophyllum brasiliense* Camb. marcados na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia – MG. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

ADULTOS (A): *Indivíduos que apresentam troncos de árvores bifurcados

NÚMERO	CAP (cm)	ALTURA (m)
A1	116	12
A2	22	8
A3	72	12
A4	33	10
A5	28+16*	8
A6	59+42*	14
A7	24	8
A8	46	9
A9	19	7
A10	91	10
A11	50	9
A12	81,5	9
A13	55	8
A14	103,5	16
A15	33	8
A16	39	9
A17	113	14
A18	81+29+19*	13
A19	67	12
A20	53	11
A21	37	9
A22	36	10
A23	53	10
A24	57	9
A25	93	15
A26	56	10
A27	43	11
A28	36	10
A29	59	12
A30	50	12

JOVENS (J):

NÚMERO	CAP (cm)	ALTURA (m)
J1	11	2,5
J2	7,5	2,7
J3	7,5	3
J4	13	4,4
J5	14	1,8
J6	12	3
J7	7,7	3
J8	13	5,5
J9	10	2,5
J10	14,3	6
J11	11,3	5,5
J12	10	4,5
J13	7,5	4
J14	10	5
J15	9,5	5
J16	9,8	4,8
J17	13	6
J18	7,9	3,2
J19	7,2	2,3
J20	12,5	7
J21	8,5	4,4
J22	12	3
J23	11	3
J24	10	2,5
J25	9,5	2,5
J26	10	3
J27	13,5	3,5
J28	7	2
J29	9,5	2
J30	12,5	3

PLÂNTULAS (P):

NÚMERO	DIÂMETRO (mm)	ALTURA (cm)
P1	6	18
P2	5	15
P3	5	14
P4	5	25
P5	6	27
P6	4	15
P7	5	25
P8	4	22
P9	6	27
P10	6	18
P11	6	30
P12	5	28
P13	6	30
P14	6	25
P15	6	27
P16	5	22
P17	6	27
P18	5	30
P19	5	29
P20	5	28
P21	4	23
P22	6	30
P23	4	23
P24	5	27
P25	5	28
P26	4	23
P27	5	28
P28	5	25
P29	6	30
P30	5	27

Número	D (mm)*	A (cm)**
P31	6	16
P32	4	23
P33	6	14
P34	6	30
P35	5	16
P36	6	23
P37	4	26
P38	4	27
P39	5	17
P40	5	26
P41	6	24
P42	6	25
P43	6	22
P44	6	25
P45	6	28
P46	6	29
P47	5	23
P48	5	24
P49	6	23
P50	6	18
P51	6	24
P52	5	25
P53	6	30
P54	6	19
P55	6	20
P56	4	23
P57	3	25
P58	4	26
P59	5	24
P60	5	24
P61	5	26
P62	5	28
P63	5	26
P64	5	24
P65	6	25

Número	D (mm) *	A (cm) **
P66	6	25
P67	6	27
P68	6	27
P69	5	30
P70	6	29
P71	6	26
P72	6	26
P73	6	25
P74	5	27
P75	6	26
P76	6	18
P77	6	18
P78	6	23
P79	6	27
P80	4	26
P81	6	30
P82	5	28
P83	5	28
P84	5	24
P85	6	24
P86	6	25
P87	6	25
P88	6	14
P89	5	19
P90	6	26
P91	6	24
P92	5	27
P93	6	29
P94	5	29
P95	6	28
P96	6	25
P97	6	24
P98	6	26
P99	5	24
P100	6	28

* DIÂMETRO; ** ALTURA

2- Protocolo para enzimas de *Calophyllum brasiliense* Camb. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.

6PGDH

.Ácido 6-fosfogluônico, Na ₃	20 mg
.NADP	1 ml
.MTT	1 ml
.PMS	1 ml
.MgCl ₂ (1%)	1 ml
.Tris Hcl 0,1M, pH 8,0	50 ml
Inocular no escuro, por 15-30 minutos a 30-37 graus	

MDH

Ácido Málico	
DL - Ácido málico	10 g
.Água destilada	80 ml
Ajustar o pH 8,0 com NaOH 1M, completar o vol. com 100 ml	
Coloração: Inocular o gel no escuro, por 15-60 min.	
.Ácido Málico 0,5M pH 8,0	4 ml
.NAD	1 ml
.MTT	1 ml
.PMS	1 ml
.Tris Hcl 0,1M pH 8,5	50 ml

PO

.O. Dianisidina	30 mg
.Etanol	25 ml
.Tampão acetato de sódio pH 5,0 (0,2M)	25 ml

.H ₂ O ₂ (30%)	1,5 ml
--------------------------------------	--------

.Agitar o Etanol e a Dianisidina e adicionar o tampão

.Inocular por 30 min. em estufa a 37 graus

.Adicionar 1,5 ml de H₂O₂ (30%) (0,5ml H₂O₂ + 1ml H₂O)

SKDH

.Ácido Xiquímico	50mg
------------------	------

.NADP	1 ml
-------	------

.MTT	1 ml
------	------

.PMS	1 ml
------	------

.Tris Hcl 0,1M pH 8,5	50 ml
-----------------------	-------

Inocular o gel no escuro, durante 30 a 60 min.

PGI

.Frutose-6-fosfato	37,5 mg
--------------------	---------

.NADP	1 ml
-------	------

.MTT	1 ml
------	------

.PMS	1 ml
------	------

.MgCl ₂ (1%)	1 ml
-------------------------	------

.Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	0,01 ml
--	---------

.Tris - Hcl 0,1M, pH 8,0	50 ml
--------------------------	-------

Adicionar G6PDH por último, incubar no escuro.

GOT

Solução A

.Ácido L-aspartico	75 mg
--------------------	-------

.Ácido alfa-Ketoglutárico	50 mg
---------------------------	-------

.Tris Hcl 0,2M, pH 8,0 50 ml

Ajustar o pH para 8,0 com NaOH

*Pode ser preparada em estoque

Solução B

.Solução A 50 ml

.Peridoxal-5-fosfato 2,5 mg

.Fast blue BB 50 mg

.Imergir a solução no gel no escuro e incubar a 30-37 graus até aparecimento das bandas

LAP

.L - Leucine 25 mg

.Fast black 30 mg

.Tampão Tris maleato 0,1M pH 5.4 20 ml

.Água destilada 50 ml

Incubar a 30-37 graus no escuro

ACP

.Alfa-Naftil Fosfato Ácido Sódio 50 mg

.Fast garnet GBC Salt 50 mg

.MgCl₂ 0,5 ml

.Tampão Acetato de Sódio 0,1M pH 5,0 50 ml

Incubar o gel no claro, pode ser observado no dia seguinte

3- Frequências genotípicas de 14 locos isoenzimáticos nos 3 grupos de ind. de *Calophyllum brasiliense* Camb. Piracicaba, ESALQ/USP. 1999.

ADULTOS:

IND	MDH	PO1	PO2	6PGD	SKD	PGI	GO1	GO2	GO3	ACP1	ACP2	ACP3	LAP1	LAP2
1	12	11	11	11	11	22	11	11	11	11	11	11	11	12
2	33	11	13	11	22	22	11	11	11	11	11	11	11	12
3	23	11	13	12	22	22	11	11	11	11	11	11	11	12
4	23	11	33	-	11	22	11	11	11	11	11	11	11	22
5	33	11	11	12	22	22	11	11	11	11	11	11	11	22
6	33	11	13	12	22	12	11	11	11	11	11	11	11	11
7	23	11	33	11	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11
8	23	11	13	11	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11
9	23	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11
10	33	11	13	12	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11
11	22	11	11	11	22	12	11	11	11	11	11	11	11	11
12	11	11	33	11	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11
13	11	11	11	11	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11
14	23	11	13	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	12
15	11	11	13	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11
16	12	11	33	-	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11
17	33	11	33	-	22	11	11	11	11	11	11	11	11	12
18	13	11	33	-	22	22	11	11	11	11	11	11	11	22
19	12	11	23	-	22	22	11	11	11	11	11	11	11	22
20	13	11	33	-	22	12	11	11	11	11	11	11	11	12
21	23	11	33	22	22	12	11	11	11	11	11	11	11	12
22	13	11	11	12	12	22	11	11	11	11	11	11	11	11
23	33	11	33	12	22	22	11	11	11	11	11	11	11	22
24	33	11	11	12	11	22	11	11	11	11	11	11	11	22
25	23	11	13	12	11	22	11	11	11	11	11	11	11	22
26	33	11	11	12	12	22	11	11	11	11	11	11	11	22
27	12	11	12	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22
28	23	11	11	22	11	22	11	11	11	11	11	11	11	22
29	33	11	33	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12
30	33	11	33	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11

JOVENS:

IND	MDH	PO1	PO2	6PGD	SKD	PGI	GO1	GO2	GO3	ACP1	ACP2	ACP3	LAP1	LAP2
1	23	11	11	11	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11
2	23	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3	12	11	11	12	22	11	11	11	11	11	11	11	11	22
4	33	11	11	12	22	11	11	11	11	11	11	11	11	12
5	23	11	11	11	22	12	11	11	11	11	11	11	11	11
6	33	11	13	11	22	22	11	11	11	11	11	11	11	22

4- Fotos de géis de eletroforese. Demonstração de padrões de gel para adultos , jovens e plântulas de *Calophyllum brasiliense* Camb. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999.