

USO DE MARCADORES RAPD E ISOENZIMÁTICOS NA  
QUANTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM  
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Esenbeckia leiocarpa*. Engl.

MILENE DA SILVA CASTELLEN

Ecóloga

Orientador: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

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

PIRACICABA  
Estado de São Paulo – Brasil  
Dezembro - 2000

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

Castellen, Milene da Silva

Uso de marcadores RAPD e isoenzimáticos na quantificação da diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia leiocarpa*. Engl. / Milene da Silva. - - Piracicaba, 2000.

76 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.  
Bibliografia.

1. Fragmento florestal 2. Guarantã 3. Marcador genético 4. População de planta 5. Variabilidade genética I. Título

CDD 634.97324

## ERRATA

Na Tabela 14 da página 44, os valores de He e Ho encontram-se em colunas trocadas.

Na página 41 onde se lê “Na figura 4” substitui-se por “Na figura 1A”

Na página 47 onde se lê “ Através da Tabela 5 ” substitui-se por “ Através da Tabela 16”

No summary onde lê “ endogamy ” substitui-se por “inbreeding”

USO DE MARCADORES RAPD E ISOENZIMÁTICOS NA  
QUANTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES  
NATURAIS DE *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

MILENE DA SILVA CASTELLEN

Aprovada em:

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

ESALQ/USP

Dr. Maria Beatriz Calheiros

IAC/Campinas

Prof. Dr. Edson Mori

UNESP/Botucatu

Suplentes:

Prof. Dr. Weber Antonio Neves do Amaral

IPIGRI/Roma

Prof. Dr. Mário Luis Teixeira de Moraes

UNESP/Ilha Solteira

Esperarei no Senhor com toda confiança,  
Ele se inclinou para mim, e ouviu meus brados.  
Tirou-me de uma fossa mortal, de um charco de lodo,  
Assentou-me os pés numa rocha,  
Firmou os meus passos.  
Pôs-me nos lábios um novo cântico,  
Um hino à glória de nosso Deus.  
Muitos verão essas coisas e prestarão homenagem a Deus.  
E confiarão no Senhor.

Salmo de Ação de Graças (39:2:3:4)

A Deus, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Uma dissertação de mestrado não se faz sozinha, na verdade existem muitos “co-autores” anônimos que durante todo tempo estiveram a meu lado, apoiando, ajudando, torcendo, lendo, criticando, discutindo e contribuindo de todas as formas, para que este trabalho pudesse chegar agora em suas mãos. Dentre estes muitos colaboradores podemos citar:

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, que me concedeu a orientação e a oportunidade de realização do mestrado.

Prof. Dr. Weber Antônio Neves do Amaral, que com sua amizade e incansável ajuda, contribuiu bastante com seus ensinamentos, para minha formação profissional.

Meus pais, Marlene e Ayrton Castellen, pela vida, e por todas as oportunidades que me deram, acreditando em mim e nunca poupando esforços para que eu chegasse até aqui.

Luiz Henrique Brunelli pelo apoio, estímulo, compreensão e afeto, que me deram forças para vencer mais esta etapa, e a seus pais Laurindo e Antonieta Brunelli pela ajuda em todos os momentos.

Meus colegas de laboratório Flávio Gandara, Alexandre Sebbenn, João Dagoberto, Eduardo Seoane, Luciano Ribas, Lúcia Wadt, Maria Beatriz Perecin, Median de Pardo, Marta Negrão, Helena Maltez e Cristina Lacerda pelas verdadeiras lições de companheirismo.

Gelson Fernandes pela amizade e ajuda nas coletas de campo.

Elza M. Ferraz por todo apoio que me foi dado nesta trajetória.

A equipe técnica do LARGEA pela amizade sincera e pela grande ajuda na realização deste trabalho: Gabriel Bortolletto, Alberto do Nascimento Maciel, Maria Andréia Moreno, Márcia Patrícia Moreno, Ester Piocentini, Fernanda e Eduardo Mazeta Lucas.

Alexandre Siqueira Coelho e Alexandre Sebben, que com suas valiosas sugestões contribuíram bastante para evolução deste trabalho.

Os membros da pré banca Maria Beatriz Perecin, Mário Moraes e Antônio Natal, pelas sugestões dadas na qualificação.

Todos os integrantes do Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP que muito me ajudaram neste período.

O assessor da FAPESP que com seus comentários, levou-me a um aprimoramento profissional e pessoal, enriquecendo muito meu trabalho.

O Instituto Florestal de São Paulo e a Fundação José Pedro de Oliveira pela permissão para realização das coletas de campo.

À FAPESP pela concessão da bolsa.

A todos, o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Introdução.....	01
1.2 Objetivos.....	04
1.3 Hipóteses.....	04
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1 A espécie <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.....	05
2.2 A Floresta Estacional Semidecidual.....	07
2.3 A fragmentação florestal.....	08
2.4 As populações naturais.....	09
2.5 A diversidade genética.....	10
2.6 Estrutura genética.....	12
2.7 Marcadores genéticos.....	13
2.8 Comparação entre marcadores RAPD e isoenzimas.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Os fragmentos sob estudo.....	20
3.1.1 Reserva Florestal de Santa Genebra.....	20
3.1.2 Estação Ecológica de Caetetus.....	21
3.1.3 Estação Ecológica de Ibicatú.....	22
3.1.4 Reserva Legal do Sítio Prainha.....	23



3.2.3	Quantificação do DNA	26
3.2.4	Seleção de primers	26
3.2.5	Reações de amplificação	27
3.2.6	Análise dos fragmentos de DNA amplificados em gel de agarose	28
3.2.7	Análise dos dados RAPD	29
3.3	Análise da distribuição da variabilidade genética através da metodologia isoenzimática	30
3.3.1	Coleta de material	31
3.3.2	Extração das enzimas	31
3.3.3	Corridas de eletroforese	32
3.3.4	Coloração dos géis	33
3.3.5	Interpretação inicial dos zimogramas	33
3.3.6	Análise dos dados	34
3.4	Comparação entre as duas metodologias	34
3.4.1	Metodologia RAPD e isoenzimática	34
3.4.2	Análise dos dados	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1	Distribuição da variabilidade genética em 4 fragmentos florestais estimada através de marcadores RAPD	35
4.1.1	Polimorfismos de marcadores RAPD	35
4.1.2	Índices de diversidade	39
4.1.3	Estatística F	39
4.1.4	Distribuição da variabilidade genética	40
4.1.5	Distância genética de Nei	41
4.2	Distribuição da variabilidade genética em 2 populações de <i>E. leiocarpa</i> detectada através de métodos isoenzimáticos	42
4.2.1	Polimorfismo enzimático	42
4.2.2	Frequências alélicas	43
4.2.3	Índices de diversidade	44
4.2.4	Teste de adequação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg	47

4.2.5 Estrutura genética.....	48
4.2.6 Distâncias genéticas de Nei (1972,1978).....	52
4.3 Comparação dos valores obtidos através das duas metodologia.....	52
4.3.1 Índices de diversidade.....	52
4.3.2 Dendrogramas UPGMA de isoenzimas e RAPD.....	54
5 CONCLUSÕES .....	56
ANEXOS.....	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Dendrograma baseado no método UPGMA.....	58
2 Esquema dos zimogramas referentes aos sistemas: MDH, ACP, PO, PGI e PGM, obtidos para <i>Esenbeckia leiocarpa</i> .....	59

## LISTA DE TABELAS

	Página
1 Índices de diversidade genética em populações naturais de espécies tropicais. Piracicaba - SP, ESALQ/USP.....	12
2 Fragmentos que contém as populações de <i>E. leiocarpa</i> estudadas, tipo de vegetação, estado de conservação, tamanho do fragmento e matriz onde está inserido o fragmento.....	24
3 Número de indivíduos coletados em cada subpopulação.....	25
4 Reagentes e concentrações utilizadas nas amplificações.....	27
5 Programa utilizado nas reações de amplificação.....	28
6 Composição da solução de extração utilizada nas análises isoenzimáticas.....	32
7 Composição do gel.....	33
8 Tampão de cuba CM.....	33
9 Número de locos analisados por primer.....	36
10 Índices de diversidade encontrados através de marcadores RAPD em 8 populações naturais de <i>E. leiocarpa</i> .....	39

11 AMOVA dos dados de marcadores RAPD de indivíduos de <i>E. leiocarpa</i> em 4 fragmentos florestais e 8 subpopulações.....	40
12 Distâncias genéticas de Nei (1972,1978) para 8 subpopulações de <i>E. leiocarpa</i> .....	41
13 Frequências alélicas encontradas nos fragmentos: Ibicatu e Prainha para a espécie <i>E. leiocarpa</i> .....	43
14 Índices de diversidade genética dos indivíduos adultos em 2 populações naturais de <i>E. leiocarpa</i> .....	44
15 Comparação entre o trabalho de Seoane (1998) e Castellen (2000) amostrando indivíduos adultos de <i>E. leiocarpa</i> em Ibicatu. Piracicaba, ESALQ/USP.....	46
16 Teste de adequação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, loco a loco.....	47
17 Estimativas de $f$ , $F$ , e $\theta_p$ para duas populações naturais de <i>E. leiocarpa</i> ....	48
18 Índices de diversidade obtidos para ambos os marcadores na subpopulação 1 de Ibicatu.....	52
19 Índices de diversidade obtidos para ambos os marcadores na subpopulação 1 de Prainha.....	52
20 Distâncias genéticas de Nei (1972, 1978) para ambos os marcadores.....	54

USO DE MARCADORES RAPD E ISOENZIMÁTICOS NA QUANTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Autora: Milene da Silva Castellen

Orientador: Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a variabilidade genética intra e interpopulacional em populações naturais de *E. leiocarpa* pertencentes a quatro fragmentos florestais do Estado de São Paulo, através de marcadores RAPD. Além dessa caracterização foi realizada a quantificação da variabilidade genética através da metodologia isoenzimática, de duas populações de dois fragmentos com a finalidade de comparar os parâmetros obtidos através de dois tipos de marcadores genéticos: isoenzimas e RAPD.

Os resultados obtidos mostraram concordância com trabalhos anteriores realizado com a mesma espécie (Seoane, 1998) através de métodos isoenzimáticos em dois fragmentos florestais: Ibicatu e Caetetus; indicando que a maior parte da variabilidade genética encontra-se entre indivíduos dentro das populações. Este dado vem somar-se a uma série de trabalhos com espécies arbóreas tropicais que afirmam que a maior parte da variabilidade genética ocorre a nível intrapopulacional

A espécie apresentou altos valores de heterozigosidade em todas as populações, estimada através das duas técnicas. A alta variabilidade genética intrapopulacional e os valores encontrados através da análise de variância de freqüências gênicas demonstram que os valores de endogamia são baixos, mostrando indícios de ausência de estruturação nas populações.

Estes resultados aliados à aderência ao teste de adequação ao EHW, demonstram que a espécie não se encontra sob o efeito de Walhund.

Em relação a comparação feita entre os parâmetros obtidos através das duas metodologias, os resultados demonstraram que existe concordância entre os parâmetros obtidos através das duas metodologias, exceto nas estimativas de heterozigosidade, onde fatores como a dominância do marcador RAPD e a pressuposição de Equilíbrio de HW, podem ter afetado as estimativas.

THE USE OF ISOZYMES AND RAPD MARKERS IN THE QUANTIFICATION OF THE GENETIC DIVERSITY IN NATURAL POPULATIONS OF *Esenbeckia leioarpa* Engl.

Author: Milene da Silva Castellen

Adviser: Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

## SUMMARY

The objective of this work was to quantify the genetic variability distribution in natural populations of *Esenbeckia leioarpa*, through RAPD markers and isozymes. With this objective two subpopulations were selected in four forestry fragments in the Sao Paulo State and analysed using RAPD markers.

Besides this, the quantification of the genetic variability through isozymes was done in populations of two forestry fragments, in order to compare the obtained parameters through two types of markers: isozymes and RAPD.

The results obtained, show an concordance with earlier works with the same specie (Seoane ,1998) through isozymes in two forestry fragments :Ibicatu and Caetetus; indicating that the larger part of the genetic variation is found within the populations. This data comes to be added to a series of works with tropical tree species, that affirm that the larger part of the genetic variation occurs within the populations.

The specie has presented high levels of heterozygosity in all populations, estimated through both techniques. The high intrapopulation genetic variability and the values found through the analysis of variance of the gene frequencies showed that the endogamy values are low, demonstrating signs of the absence of population structuring. This results allied to the adherence to the suitability to



the HW equilibrium, demonstrated that the specie does not find itself under the Walhund effect.

In relation to the comparison done among the parameters obtained through both of the methodologies, the results demonstrated that there is a concordance among the parameters obtained through both methodologies except in the heterozygosity values, where factors such as the dominance of the RAPD marker and the assumption of the HW equilibrium, may have affected the estimates.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Introdução

A Floresta Estacional Semidecidual compõe um complexo ecossistema florestal, que representa uma fonte considerável de recursos genéticos. No entanto, atualmente existem relativamente poucos trabalhos realizados neste ecossistema que, devido à expansão agrícola e urbana, tem sido destruído rapidamente. A velocidade dos desmatamentos é sem precedentes na história evolutiva das florestas, acarretando efeitos profundos em todo ecossistema (Bierregaard et al., 1992).

Neste contexto, as espécies arbóreas nativas possuem grande importância para manutenção da biodiversidade e estruturação da floresta tropical como um todo. Nos últimos anos, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos pelo LARGEA - Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas - ESALQ/USP com o intuito de conhecer a estrutura genética das populações de espécies arbóreas tropicais com finalidades conservacionistas.

*Esenbeckia leiocarpa* é uma espécie arbórea que ocorre na Floresta Estacional Semidecidual, bastante utilizada em construções rurais pela durabilidade de sua madeira. Segundo Rodrigues (1999), a espécie está entre as mais afetadas pelo extrativismo na região de Piracicaba. Desta forma, o estudo da estrutura genética e da diversidade da espécie faz-se necessário para o delineamento de estratégias visando à conservação das populações em

seu próprio habitat, com as perspectivas de manutenção da diversidade e garantia de sua sustentabilidade.

Durante anos, a variabilidade genética das populações naturais tem sido caracterizada por estudos isoenzimáticos, que se mostraram eficientes para a avaliação dos níveis de variabilidade e sua distribuição.

Seoane (1998) avaliou a variabilidade genética de *E. leiocarpa* em dois fragmentos florestais: Ibicatu e Caetetus, através de métodos isoenzimáticos. Contrariamente ao que se suponha para uma espécie comum de distribuição agregada, com polinizadores de vôo curto, os resultados demonstraram existir uma baixa endogamia nas populações que se encontravam aderindo às proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As estimativas de fluxo gênico entre subpopulações dos fragmentos foram altas, mostrando uma intensa troca gênica, principalmente em Ibicatu, sendo que a maior parte da variabilidade genética ocorreu em nível intrapopulacional.

Durante anos, a maioria dos estudos realizados na área de genética de populações tinha como metodologia principal para obtenção de parâmetros genéticos a técnica utilizada por Seoane (1998) e inúmeros pesquisadores: as isoenzimas. No entanto, recentemente tem aumentado o número de trabalhos que utilizam novos marcadores moleculares na obtenção desses parâmetros.

O desenvolvimento do processo da reação da polimerase em cadeia (PCR) permitiu a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Este processo destacou-se por sua rapidez e versatilidade, tornando-se rapidamente uma das ferramentas mais poderosas em estudos genéticos moleculares.

A partir desta técnica, derivaram-se inúmeros marcadores como RAPD, AFLPs e microssatélites. Estas técnicas possibilitaram a detecção de polimorfismo genético diretamente no nível de DNA.

Dentre os diversos marcadores moleculares, este estudo enfocará a classe de marcadores denominada RAPD. A técnica de RAPD tem se

destacado entre outras metodologias devido à maior praticidade, menor custo e reduzidas dificuldades experimentais quando comparada a outras técnicas. Catalan et al. (1997) realizaram um estudo piloto, utilizando a metodologia RAPD em 210 indivíduos (adultos e progênies) de *E. leiocarpa* em Ibicatu. Para isto, os pesquisadores realizaram algumas adaptações ao protocolo de extração proposto por Doyle & Doyle (1987), testando o programa de amplificação que melhor se adaptou à espécie. Foram selecionados 12 primers dos Kits AA e AB testados, que geraram 24 marcadores polimórficos a serem analisados. Como resultado, esse estudo indicou um baixo número de marcadores polimórficos. A metodologia RAPD utilizada neste trabalho baseou-se principalmente no estudo piloto realizado por Catalan em 1997, que forneceu indicações sobre a adequação da metodologia à espécie.

Desse modo, com o advento de novas metodologias, torna-se iminente a necessidade de trabalhos que, além de quantificar os níveis de variabilidade e analisar a estrutura genética das populações, avaliem a coerência das comparações entre os resultados obtidos através das duas metodologias.

## 1.2 Objetivos gerais

- Quantificar a distribuição da variabilidade genética de duas subpopulações naturais de *E. leiocarpa* pertencentes a dois fragmentos florestais através de métodos isoenzimáticos.
- Caracterizar a variabilidade genética intra e interpopulacional em oito subpopulações naturais de *E. leiocarpa* pertencentes a quatro fragmentos florestais do Estado de São Paulo, através de marcadores RAPD.
- Verificar se as populações encontram-se nas proporções de Equilíbrio de HW.
- Comparar os parâmetros obtidos através dos dois tipos de marcadores genéticos: RAPD e isoenzimas.

## 1.3 Hipóteses

- As populações da espécie *E. leiocarpa* encontram-se sob o efeito de Walhund , apresentando uma tendência ao excesso de homozigotos nas populações.
- As populações da espécie não se encontram nas proporções de Equilíbrio de HW.
- Os resultados dos parâmetros genéticos obtidos com a técnica de RAPD e isoenzimas são similares.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

A espécie *Esenbeckia leiocarpa* também conhecida como guarantã (SP), goiabeira (BA) ou guarataia (ES) pertence à família Rutaceae, sendo uma árvore de porte médio (20 a 30 m), diploíde, alógama, típica de estágios finais de sucessão (Durigan, 1997).

Sua distribuição geográfica tem início no sul da Bahia, passando por Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, na Floresta Estacional Semidecidual (Lorenzi, 1992). Apresenta distribuição agregada e descontínua, ocorrendo em frequência elevada em várias áreas.

O cerne, segundo Pereira (1929), é amarelo, machetado de dourado, brilhante, com fibras grossas e grande camada de alburno duro. Sua madeira é muito utilizada para postes, esteios, morões, cabos de ferramentas e na construção civil por sua durabilidade em ambientes externos.

As folhas do guarantã são simples, glabras, coriáceas, brilhantes, de 10 a 20 cm de comprimento por 5 a 8 cm de largura (Crestana et al., 1982).

Suas flores são hermafroditas, actinomorfas, pequenas branco-esverdeadas, levemente pilosas. O estigma é circundado por um disco glandular proeminente, pentagonal, onde se situam as glândulas de néctar. A espécie apresenta assincronismo entre o período ativo do androceu (produção e liberação de pólen) e do gineceu (receptividade e polinização) na mesma flor, o que caracteriza o fenômeno da protandria (Crestana et al., 1982).

A polinização é feita por pequenos insetos e o estágio reprodutivo tem início por volta dos dez anos, apresentando florescimento a partir do final do mês de setembro, prolongando-se até janeiro.

O fruto consiste numa cápsula lenhosa com saliências espessas que formam cinco gomos. Quando maduro, o fruto abre somente no vértice dos gomos liberando sementes castanho escuras muito duras. A maturação dos frutos ocorre durante os meses de julho a agosto (Crestana et al., 1982).

A deiscência dos frutos é explosiva (a dispersão das sementes fica limitada inicialmente de 5 a 10 metros). Segundo Costa (informação pessoal) a dispersão da espécie é favorecida na Floresta Estacional Semidecidual, pois, no período do inverno, algumas espécies do dossel perdem parcialmente ou totalmente as folhas, criando no interior da floresta ambientes semelhantes a clareiras, favorecendo a floração de algumas espécies e propiciando condições para que as espécies autocóricas sejam dispersadas.

A dispersão secundária também ocorre na espécie, visto que tem se observado freqüentemente que algumas sementes podem ser dispersas por pássaros (*Leptotila* sp.) a alguns quilômetros de distância. Na espécie, a condição autocórica levou à concentração das sementes embaixo e próximo da árvore-mãe, criando condições propícias para a dispersão secundária por aves, formigas, pequenos e grandes mamíferos (Costa, informação pessoal).

A estimativa de fluxo gênico em populações da espécie foi estudada por Seoane (1998) que detectou valores relativamente altos em duas populações do Estado de São Paulo: Ibicatu ( $N_m=4,40$ ) e Caetetus ( $N_m=1,16$ ).

Agrupamentos de indivíduos nas fases iniciais do ciclo de vida acontecem logo após a germinação, no entanto a densidade das plântulas tende a diminuir à medida que fatores de mortalidade começam a atuar sobre as mesmas.

A espécie apresenta uma boa permanência em fragmentos florestais, tendo sido encontrada em abundância em vários levantamentos

fitossociológicos realizados em fragmentos nas cidades de Piracicaba, Campinas, Rio Claro e Anhembi .

O critério usado para seleção da espécie foi baseado na existência de informações prévias a respeito da fenologia, produção anual de sementes, índices de diversidade genética obtidos a partir de isoenzimas e adequação da metodologia RAPD para a espécie, além de sua importância para comunidade local.

## 2.2 A Floresta Estacional Semidecidual

A Floresta Estacional Semidecidual costumava ser o ecossistema dominante no interior do Estado de São Paulo, até o início do século XIX. No entanto, com o advento da cultura cafeeira e posteriormente da cultura canavieira, uma considerável porção da floresta original foi destruída, tornando-se restrita a pequenos e esparsos fragmentos.

O conceito ecológico deste tipo de vegetação está condicionado pela dupla estacionalidade climática, uma tropical com época de intensas chuvas de verão seguidas por estiagem acentuada, e outra subtropical sem período seco, mas com seca fisiológica provocada pelo intenso frio do inverno, com temperaturas médias inferiores a 15°C (IBGE, 1992).

Observando a fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta estacional semidecidual, pode-se perceber que a vegetação apresenta ritmos reprodutivos e de crescimento durante o decorrer do ano que se evidenciam pela perda de folhas nos meses mais secos (julho-agosto), seguida pelo brotamento das mesmas no início da estação úmida (Morellato, 1991, 1995).

De acordo com Morellato (1992), a Floresta Estacional tem diversidade florística alta com algumas famílias caracteristicamente representadas: *Leguminosae*, *Rutaceae*, *Meliaceae*, *Euphorbiaceae*, *Myrtaceae*, *Rubiaceae* e *Lauraceae*. Estas famílias sempre apresentam um considerável número de



espécies, ocupando os primeiros lugares no que se refere à riqueza específica e ao número de indivíduos.

### **2.3 A fragmentação florestal**

A fragmentação florestal é o processo pelo qual áreas contínuas de floresta são reduzidas em tamanho a dois ou mais fragmentos florestais devido à destruição do habitat original (Lovejoy et al., 1986; Saunders et al., 1991).

O isolamento de parte de um ecossistema acarreta uma série de mudanças na biota. Estas modificações ocorrem em função da natureza genética das populações isoladas, da distância entre elas e outras populações similares, do tipo de barreira que causa o isolamento, do tamanho e da forma da área isolada, dentre outros fatores que hoje são objetos de estudo em vários países (Almeida Júnior, 1999).

Uma das principais conseqüências da fragmentação é a redução da diversidade. Este fato ocorre em função dos fatores que afetam a demografia de populações isoladas como: aumento da endogamia, dificuldades na polinização e dispersão, aumento da predação de sementes, efeito de borda e alterações na taxa de recrutamento de plântulas (Vianna et al., 1990).

Do ponto de vista genético, as principais conseqüências da diminuição do tamanho populacional, causados pela fragmentação, são a deriva genética e a endogamia.

A deriva genética muda a distribuição da variação genética de duas formas: diminuindo a variação dentro de populações e aumentando a diferenciação entre elas. O grau que a deriva leva às populações isoladas à homogeneização e conseqüentemente ao aumento da divergência entre elas depende da ação do fluxo gênico. O fluxo gênico possui o efeito de uniformizar a composição genética das populações isoladas de modo que, na ausência de seleção, se a população for grande o suficiente para que a deriva possa ser

ignorada, o fluxo gênico irá homogeneizar as freqüências alélicas em todas as populações (Perecin, 2000).

A outra conseqüência do efeito de fragmentação e/ou autofecundação é a endogamia que consiste no cruzamento de indivíduos aparentados, levando a homozigose dentro das populações. A perda de vigor decorrente da endogamia é conhecida como depressão endogâmica. Desse modo, a endogamia acarreta uma diminuição dos níveis de variação genética resultando numa baixa taxa de recrutamento e potencial risco de extinção (Hamrick & Lovelless, 1984).

#### **2.4 As populações naturais**

O termo população vem sendo empregado com uma série de significados, tanto por ecólogos quanto por geneticistas.

Os ecólogos, em geral, consideram como população um conjunto de organismos, geralmente da mesma espécie, tendo como propriedade de maior interesse o aspecto demográfico. Este aspecto também desperta interesse na área de genética de populações não apenas porque afeta o número de indivíduos, mas também porque influi na estrutura e organização do conjunto gênico.

O critério de população geralmente adotado pelos geneticistas é o que a define como um grupo de indivíduos geneticamente conectados através de parentesco ou reprodução. Uma população mendeliana (unidade panmítica ou deme) é um grupo de indivíduos, geneticamente isolados ou semi-isolados de outros grupos, que se reproduzem efetivamente ao acaso.

A realidade das populações naturais geralmente difere desta condição ideal, no entanto, suas propriedades genéticas podem ser relativamente descritas pelas populações mendelianas se a extensão e natureza de suas diferenças puderem ser determinadas.

A população idealizada é aquela que segue o modelo clássico sugerido por H. G. Hardy e W. Weinberg. Este modelo sugere que em uma população

infinita de cruzamentos aleatórios, na qual não existem forças perturbadoras de mutação, migração ou seleção, as frequências genotípicas binomiais e as frequências alélicas permanecerão constantes em gerações subsequentes.

Este modelo de construção intelectual procurou abstrair as características essenciais dos infinitos detalhes que acompanham os fenômenos naturais (Clegg, 1980). Segundo Futuyama (1997), estas discrepâncias entre a população ideal de Hardy-Weinberg e as populações reais são constituídas justamente pelos ingredientes da evolução.

## **2.5 A diversidade genética**

O conceito de diversidade genética proposto por Nei (1973,1978) está associado à variação genética existente em uma dada espécie, sendo a heterozigidade esperada a medida mais apropriada para quantificar a diversidade. O mesmo autor justifica esta afirmação destacando que este índice não depende da definição arbitrária de polimorfismo e pode ser definido em termos de frequências gênicas.

A variabilidade genética de uma dada espécie fornece matéria-prima necessária para as mudanças evolutivas, influenciando nas performances fisiológicas e demográficas das populações (Weir, 1990; Huenneke, 1991).

A caracterização da variabilidade genética de populações naturais constitui um conhecimento básico para o planejamento das estratégias de conservação genética, domesticação e melhoramento (Kageyama, 1987).

A magnitude desta variação pode ser medida no campo através de métodos biométricos ou em laboratório através de marcadores genéticos como isoenzimas, RAPDs e microssatélites.

A compreensão da variação genética depende da estimativa de parâmetros genéticos como: proporção de locos polimórficos, número médio de alelos por loco, heterozigidade observada e heterozigidade média esperada.

O acúmulo de informações sobre a variabilidade genética em populações naturais permitiu que Hamrick (1989) reunisse informações a respeito de 449 espécies, concluindo que espécies perenes, de ciclo de vida longo, reprodução sexuada por fecundação cruzada típica de estágios avançados de sucessão e distribuição geográfica ampla, apresentam maior parte da variabilidade dentro de suas populações do que entre populações.

Segundo Hamrick (1979, 1983), muitas espécies arbóreas possuem efetivos meios de dispersão de genes e com isto mantêm altos níveis de variação genética dentro das populações, com pouca diferenciação genética entre populações.

Os valores obtidos para diversidade genética em espécies arbóreas podem ser bastante variáveis. Na Tabela 2, pode-se visualizar alguns dos valores encontrados em espécies tropicais estudadas pelo LARGEA (Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas) - ESALQ/USP nos últimos anos.

Tabela 1. Índices de diversidade genética em populações naturais de espécies tropicais. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2000.

Espécie	Diversidade gênica (He)	Referência
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>	0,175	Seoane, 1998
<i>Maytenus aquifolia</i>	0,255	Perecin, 2000
<i>Hevea brasiliensis</i>	0,241	Paiva, 1994
<i>Cedrela fissilis</i>	0,243	Gandara, 1996
<i>Couratari guinensis</i>	0,429	Lepsh-Cunha, 1996
<i>Couratari multiflora</i>	0,436	Lepsh-Cunha, 1996
<i>Chorisia speciosa</i>	0,284	Souza, 1997
<i>Myracroruon urundeuva</i>	0,075	Lacerda, 1997
<i>Genipa americana</i>	0,165	Sebbenn, 1997
<i>Euterpes edulis</i>	0,449	Reis, 1996

## 2.6 Estrutura genética

A organização dos níveis de variabilidade entre e dentro de populações é definida como estrutura genética e é decorrente de fatores que afetam o comportamento dos alelos na população tais como: seleção natural, fluxo gênico, deriva genética, sistema reprodutivo e níveis de endogamia. Tais fatores podem explicar o comportamento de alelos nas populações (Wright, 1943). Os principais fatores ecológicos envolvidos são a síndrome de dispersão de pólen e sementes, os quais determinam em parte a distribuição espacial e geográfica.

Para caracterizar a estrutura genética, entendida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais, três abordagens são geralmente utilizadas: análise da diversidade em populações subdivididas (Nei, 1973), as estatísticas F de Wright (Wright, 1951, 1965) e os coeficientes de coancestralidade de Cockerham (1969).

As três abordagens apresentam equivalência. Apesar disto, os coeficientes de coancestralidade possibilitam um maior número de estimativas nos diferentes níveis hierárquicos: alelos dentro de indivíduos, dentro de populações, dentro de locais, dentro de regiões e assim por diante, conforme a estratégia de amostragem empregada (Reis, 1996).

Na caracterização da estrutura genética em populações de *Esenbeckia leiocarpa*, optou-se por utilizar as estatísticas F, estimadas pelo método de Weir e Cockerham (1969; 1984) através dos valores de F (coeficiente de endogamia total), f (coeficiente de endogamia da população) e  $\theta$  (coeficiente de coancestralidade), que mede a endogamia gerada pelo efeito de subdivisão, estimando a divergência entre as populações.

## **2.7 Marcadores genéticos**

Segundo Robinson (1998), os marcadores genéticos são definidos como caracteres qualitativos com herança mendeliana simples, facilmente reconhecida e cuja expressão não é influenciada pelo ambiente. Os marcadores genéticos têm contribuído bastante em estudos de ecologia evolucionária, através de métodos que detectam as diferenças genéticas entre indivíduos e populações.

Os primeiros marcadores genéticos foram os morfológicos. Estes marcadores são controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral de fácil identificação visual. No entanto, estes marcadores apresentavam certas limitações como o baixo número de locos e o fato de

poucas espécies apresentarem características de fácil identificação com herança mendeliana simples.

No entanto um fator importante consiste na evidência de que algumas características podem interferir no processo biológico, visto que algumas exercem influência sobre o valor adaptativo da planta. Segundo Cotrim (1997), os métodos morfológicos podem requerer muito tempo de análise e um particular cuidado na planificação e desenho experimental, pois, tratando-se de análise de fenótipos, os seus resultados podem ser fortemente influenciados pelas condições ambientais. Assim, têm-se tornado pouco práticos do ponto de vista rotineiro em estudos de conservação.

O estudo da variação genética em plantas obteve grande avanço com o advento de marcadores genéticos bioquímicos como os isoenzimáticos.

O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (Robinson, 1998).

Esta técnica consiste na colocação de extratos de tecidos de diversos indivíduos num gel poroso, através do qual é aplicado um potencial elétrico. A diferenciação na composição de aminoácidos e nas cargas elétricas confere às enzimas movimentação de modo que tendem a se separar num gel. Suas posições no gel são encontradas através de sistemas específicos de coloração. Após o processo de coloração, diferentes genótipos são identificados pelas variações de posição da banda no gel (Alfenas, 1991).

A técnica em que se baseia esta metodologia é a eletroforese. O termo eletroforese é definido como a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico. Seu princípio é simples: as moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo e as moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo.

O emprego da técnica de isoenzimas contribuiu com informações importantes para os mais diferentes aspectos da genética vegetal. Os estudos isoenzimáticos foram pioneiros e permitiram detectar os diversos níveis de

variabilidade genética em populações de várias espécies vegetais (Hurtrez-Bousses, 1996; Gandara, 1996; Souza, 1997).

A maioria das espécies estudadas tem demonstrado altos níveis de variabilidade para os locos enzimáticos conhecidos, sendo que as isoenzimas se expressam codominantemente, permitindo a identificação de heterozigotos e segregando em taxas mendelianas normais, o que possibilita a identificação do genótipo de cada indivíduo e a estimativa dos parâmetros genéticos (Paiva, 1992). A codominância é uma vantagem importante deste marcador, visto que permite estimar diretamente as freqüências genotípicas alélicas e, a partir destas, os coeficientes de diversidade e heterozigosidade.

Dentre as outras vantagens da técnica pode-se citar seu custo relativamente barato e acessível, podendo diversos locos serem analisados rápida e simultaneamente.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), a técnica apresenta como principal limitação o baixo nível de polimorfismo. O baixo nível de locos polimórficos deve-se ao fato do nível de polimorfismo enzimático possuir um limite, uma vez que essas enzimas possuem uma função metabólica além do limite de detecção intrínseco à técnica. Este nível de resolução não permite a cobertura completa do genoma, limitando certas áreas de estudo como a construção de mapas genéticos ou caracterização detalhada do germoplasma.

Outro aspecto muito discutido da técnica é que, após vários anos de pesquisas com métodos isoenzimáticos, pesquisadores renomados têm levantado questionamentos a respeito da neutralidade dos locos. Estes questionamentos baseiam-se na existência de uma grande correspondência entre a variação isoenzimática e a variação nas características de desenvolvimento ligada à adaptação encontrada em vários estudos. Segundo Torggler et al. (1995), é possível afirmar que alguma porção da variação alélica isoenzimática responde à seleção, mas o tamanho desta porção ainda não pode ser estimado.



Recentemente, com o advento de novas tecnologias, iniciou-se uma verdadeira revolução na biologia molecular.

O desenvolvimento do processo da reação da polimerase em cadeia (PCR) permitiu a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Sua escala de amplificação permite iniciar com quantidades mínimas de DNA e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse.

Este processo destacou-se por sua rapidez e versatilidade, tornando-se rapidamente uma das ferramentas mais poderosas em estudos genéticos moleculares.

A partir desta técnica, derivaram inúmeros marcadores como RAPD, AFLP's e microssatélites, definidos como marcadores moleculares, que possibilitaram a detecção de polimorfismo genético diretamente no nível de DNA.

Dentre os diversos marcadores moleculares, enfocar-se-á neste estudo a classe de marcadores denominada RAPD. A metodologia RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) consiste na amplificação ao acaso de fragmentos de DNA com um único "primer" de seqüência arbitrária, que irá traduzir-se na síntese final de vários segmentos de DNA de diferentes tamanhos. A partir deste conjunto de fragmentos (perfil de RAPD) é possível detectar polimorfismos na seqüência do DNA que podem ser usados como marcadores genéticos, medindo a similaridade entre indivíduos dentro de populações (Williams et al., 1990).

A metodologia RAPD é uma técnica de interesse em vários aspectos da biologia molecular (Hardrys et al., 1992; Milligan & Mc Murry, 1993), podendo ser utilizada para obtenção de "fingerprinting" genômicos de indivíduos e variedades (Quiros et al., 1991; Wilde et al., 1992), estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies, construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica, localização de genes de interesse

econômico (Rafalski et al., 1991) e análise da estrutura e variabilidade genética de populações de várias espécies (Chalmers et al., 1992; Dawson et al., 1994; Huff et al., 1993).

Dentre suas vantagens, pode-se citar o fato dos locos RAPD amostrarem regiões não codantes, podendo serem ou não ligados a genes estruturais, revelando uma dimensão diferente da variação genética. Além disso, a técnica requer pequenas quantidades de DNA e possibilita a obtenção de um número maior de locos marcadores.

Quanto às desvantagens apresentadas pela técnica, a principal delas é a dominância. A detecção dos segmentos RAPD não possui sensibilidade suficiente para discriminar os homozigotos dominantes dos heterozigotos. A técnica detecta apenas um alelo em cada loco, o que a torna um marcador dominante, ou seja, a presença de uma dada banda não distingue se seu loco respectivo é homozigoto ou heterozigoto. No entanto, a "frequência" dos alelos RAPD pode ser estimada por métodos indiretos, empregando a frequência observada dos indivíduos que não apresentam o determinado fragmento, isto é, a frequência de fragmentos nulos (Lynch & Milligan, 1994). Esta abordagem corresponde a assumir que a população sob estudo está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Atualmente, a repetibilidade dos marcadores RAPD tem sido questionada em vários estudos (Weeden et al., 1990; Penner et al., 1993). Inúmeros trabalhos vêm sendo realizados enumerando fatores que afetam a repetibilidade das análises. Mínimas mudanças nas condições de reação podem alterar significativamente o número e a intensidade dos produtos amplificados, tornando a repetibilidade difícil de ser mantida (Halldén et al., 1996).

Sabendo disso, é necessário que sejam tomadas medidas confiáveis para manter a repetibilidade dos experimentos como as sugeridas por Tansley et al., 2000 e Heun et al., 1994. Deste modo, é recomendável que sejam feitas pelo menos duas repetições da mesma corrida, sendo que as amostras desta

duplicata devem ser amplificadas em diferentes ocasiões e corridas em diferentes géis. Durante as análises todos os géis e suas respectivas repetições devem ser rigidamente avaliados, visando a obter uma boa reproducibilidade dos mesmos.

As diferenças inerentes às duas metodologias (expressão genética, região amostrada no genoma, número de locos) levam a concluir que tanto isoenzimas quanto RAPDs possuem vantagens e desvantagens como marcadores genéticos, cabendo ao pesquisador definir qual apresentará maior eficiência de acordo com as suas necessidades.

O uso eficiente dos marcadores genéticos deve considerar: a base genética do polimorfismo revelado pelo marcador, os aspectos técnicos do método e suas vantagens e limitações (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

## **2.8 Comparação entre marcadores RAPD e isoenzimas**

Atualmente, alguns trabalhos têm se aplicado a estudar conjuntamente os dois marcadores. Estes estudos provêm dados experimentais para verificar os méritos dos dois métodos e indicar o quanto as medidas de variabilidade obtidas a partir das duas metodologias podem ser similares. No entanto, consultando a literatura percebe-se que muita divergência tem ocorrido neste campo.

Isabel et al. (1995) e Aagard et al. (1998) encontraram congruência entre os resultados obtidos através de RAPD e isoenzimas para *Picea mariana* e *Pseudotsuga menziessi* respectivamente, enquanto Fornari et al. (1999) obtiveram congruência de resultados com *Castanea sativa* apenas quando a diferenciação genética entre as populações era relativamente alta.

Liu & Furnier (1993) efetuaram trabalhos comparando três classes de marcadores RAPD isoenzimas e RFLP em *Populus tremuloides* e *P. grandidentata*. As estimativas obtidas através de isoenzimas e RFLP foram bastante similares, enquanto que o marcador RAPD superestimou a

variabilidade na espécie *Populus grandidentata* quando comparado aos outros dois marcadores ( $\square_e=0,35$  e  $0,28$  para RAPD e isoenzimas, respectivamente). Já para a espécie *P. tremuloides*, os valores encontrados através de isoenzimas e RAPD foram bastante similares. Deste modo, os autores sugerem cautela no uso de marcadores RAPD para estimar a variabilidade genética considerando-o mais indicado em estudos de fingerprinting.

Fato similar ocorreu com Szmidt et al. (1996) estudando duas populações de *Pinus silvestris*. Uma das populações estudadas apresentou valores similares entre as duas metodologias ( $\square_e=0,30$  através de RAPD e  $\square_e=0,28$  através de isoenzimas), enquanto outra população apresentou valores significativamente diferentes ( $\square_e=0,36$  e  $0,26$ ) para RAPD e isoenzimas, respectivamente.

Em ambos os casos de discrepância entre os resultados obtidos, pode-se observar que os valores estimados a partir da metodologia RAPD são, em geral, mais altos em relação aos isoenzimáticos (Sonnante et al., 1997).

Lannner-Herrera et al. (1996) justificam este fato considerando que isoenzimas representam seqüências codantes que estão sob grande pressão de seleção para manter seqüências funcionais, enquanto RAPDs provavelmente são gerados a partir de pequenas e repetidas seqüências aleatórias que improvavelmente envolvem proteínas codantes. Segundo os autores, os dados RAPD e isoenzimáticos provêm diferentes enfoques da situação.

Quando o objetivo das pesquisas é avaliar a diferenciação entre acessos, populações e subespécies, parece haver uma congruência entre os resultados obtidos através das duas metodologias. Futuoka et al. (1992) e Heun et al. (1994) analisaram a diferenciação de 16 espécies de arroz e acessos de *Avena sterilis*, respectivamente, e obtiveram resultados similares entre isoenzimas e RAPD. O mesmo aconteceu com Maab et al. (1995) em seus estudos com *Allium sativum*.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Os fragmentos sob estudo**

##### **3.1.1 Reserva Florestal de Santa Genebra**

A Reserva Florestal Mata de Santa Genebra está situada em área urbana dentro do distrito de Barão Geraldo, município de Campinas, nas seguintes coordenadas geográficas: 22° 49' 45" S e 47° 06' 33" W.

A Reserva ocupa uma área de 251,77 m<sup>2</sup>, sobre latossolo roxo, com topografia levemente ondulada, clima Cwa segundo Köeppen (quente e úmido com inverno seco e verão quente e chuvoso).

Segundo Sabino & Polydoro (2000), a vegetação é do tipo Floresta Estacional Semidecidual, com árvores de porte variável entre 25 e 30 m, apresentando alguns indivíduos emergentes e estratos inferiores bem desenvolvidos. Em alguns locais a floresta é claramente secundária, exibindo diferentes estágios de sucessão, muitos deles ricos em cipós e plantas típicas de microambientes mais expostos à luz.

A mata de Santa Genebra exhibe, em sua flora e fauna, características de sazonalidade climática desta região do Brasil, evidenciando uma estação seca e mais fria (maio-setembro) e uma estação quente e chuvosa (outubro-abril).

### 3.1.2 Estação Ecológica de Caetetus

A Estação Ecológica dos Caetetus pertence ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo, possuindo as seguintes coordenadas geográficas: latitude 22°22'S a 22°27'S e longitude 49°40'W a 49°43'W, localizando-se nos municípios de Gália e Alvilândia.

A área da Estação Ecológica dos Caetetus é de 2.178 ha, apresentando topografia ondulada em sua maior extensão, com altitude variando de 500 m a 680 m.

O solo é do tipo Pve - Podzólico, vermelho-amarelo, eutrófico altamente susceptível à erosão. O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwa com temperatura máxima anual de 30°C, mínima de 10°C e média de 20°C. A precipitação anual é de 1.480 mm e está concentrada nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, sendo maio e junho os meses mais secos do ano (Perecin, 2000).

A floresta é do tipo Estacional Semidecidual, apresentando espécies florestais típicas desses locais como leiteiro-preto (*Pouteria ramiflora*), jatobá (*Hymenaea nstilbocarpa*), óleo-de-copaíba (*Copaifera lagsdorffii*), bem como, nas baixadas e encostas, árvores de grande porte como peroba-rosa (*Aspidosperma poíyneuron*), cabreúva (*Myroxylon peruiferun*), pau-d'alho (*Galiesia integrifolia*), palmito-branco (*Euterpe edulis*) e figueira-vermelha (*Ficus sp*).

A flora em Caetetus está quase intacta e a área é considerada uma das maiores coberturas vegetais do centro-oeste do Estado de São Paulo.

### 3.1.3 Estação Ecológica de Ibicatu

A Estação Ecológica de Ibicatu é administrada pelo Instituto Florestal, possuindo as seguintes coordenadas geográficas: latitude de 22° 47' a 22° 48'S e longitude 47° 49' a 47° 50' W numa área de 76 ha pertencente ao município de Piracicaba.

Através do decreto nº 33261 de 29 de julho de 1958, a área foi considerada de utilidade pública, no entanto, apenas em 12 de março de 1987, através do decreto nº 26890, a antiga Reserva de Ibicatu foi transformada em Estação Ecológica (Leão, 1994).

Segundo Ranzini (1966), a topografia do fragmento é pouco acidentada, com desníveis de 50 a 100 m entre interflúvios e vales, sendo que a altimetria varia entre 450 m, na várzea do Tietê a sudoeste, até 750 m nos topos mantidos pelos sills de diabásio, no divisor Tietê - Piracicaba (Morros São Joaquim, Monte Branco, Pau D'Alho, Boa Esperança e Pico Alto).

O solo da região de estudo está classificado na série Anhumas com perfis profundos. O tipo climático regional pertence ao tipo Cwa segundo Köppen, a temperatura média do mês mais quente é de 22°C, podendo ocorrer geadas esporádicas durante o inverno. A precipitação média anual é de 1257 mm (Leão, 1994).

O fragmento pertence ao domínio da Floresta Estacional Semidecidual. Em levantamentos efetuados por Costa (1992) na região, a espécie *E. leiocarpa* está entre as mais abundantes, com maiores IVI (índice de valor de importância) e com maiores DR (densidade relativa), DOR (dominância relativa) e FR (frequência relativa) no primeiro estrato.

### 3.1.4 Reserva Legal do Sítio Prainha

O fragmento estudado localiza-se a aproximadamente 3 Km de Ibicatu, numa área de aproximadamente 150 ha abrangendo várias propriedades particulares. Este estudo limitou-se a uma população localizada na porção oeste do fragmento na reserva legal pertencente ao sítio Prainha de propriedade do Sr. Miguel Pinã Garcia.

Este fragmento era parte de uma antiga fazenda que foi desmembrada entre os herdeiros do dono da propriedade. O fragmento estudado servia como reserva de recursos madeiros da fazenda, e seu antigo dono manifestou antes de sua morte o desejo de que aquela porção de mata fosse preservada. Atualmente, o fragmento é circundado em sua maior parte por áreas de pastagem e a exploração madeirera não ocorre há mais de 10 anos no local pesquisado. A população de *E. leiocarpa* estudada consiste em indivíduos remanescentes da exploração madeireira, fato este que ocorreu devido a estarem situados num local de difícil acesso.

A reserva legal do Sítio Prainha é um exemplar da Floresta Estacional Semidecidual que apresenta topografia acidentada com altas declividades. Devido à proximidade entre os fragmentos, o tipo climático e a precipitação média anual são similares aos que ocorrem na Estação Ecológica de Ibicatu.



Tabela 2. Fragmentos que contêm as populações de *E. leiocarpa* estudadas, tipo de vegetação, estado de conservação, tamanho do fragmento e matriz onde está inserido o fragmento.

Fragmento estudado	Tipo de vegetação	Estado de conservação	Tamanho do Fragmento	Matriz
Estação Ecológica de Ibicatu	Floresta Estacional Semidecidual	Secundária	76 ha	Pastagem
Reserva legal do Sítio Prainha	Floresta Estacional Semidecidual	Secundária	150 ha	Pastagem e culturas agrícolas
Mata de Santa Genebra	Floresta Estacional Semidecidual	Secundária	251,7 ha	Área urbana e culturas agrícolas
Estação Ecológica de Caetetus	Floresta Estacional Semidecidual	Primária	2178 ha	Culturas agrícolas

Fonte: Elaboração da autora

### 3.2 Análise da distribuição da variabilidade genética através de marcadores RAPD

Visando a quantificar a distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *E. leiocarpa*, foram selecionadas duas subpopulações em cada um dos quatro fragmentos estudados (Prainha, Ibicatu, Caetetus e Santa Genebra). Estas subpopulações foram analisadas através de marcadores RAPD, segundo as recomendações de Catalan et al. (1997) e Ferreira & Grattapaglia (1995).

### 3.2.1 Coleta de material

Foram coletadas folhas de indivíduos adultos nos quatro fragmentos. A seguir, as folhas foram encaminhadas ao LARGEA – ESALQ/USP onde foram liofilizadas. O número de indivíduos coletados em cada subpopulação é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Número de indivíduos coletados em cada população.

População	Número de indivíduos
Ibicatu (subpopulação 1)	53
Ibicatu (subpopulação 2) Prainha	25
(subpopulação 1) Prainha	53
(subpopulação 2) Caetetus	24
(subpopulação 1) Caetetus	46
(subpopulação 2) Santa Genebra	33
(subpopulação 1) Santa Genebra	23
(subpopulação 2) Total	12
Fonte: Elaboração da autora	270

### 3.2.2 Extração de DNA genômico

Na extração do DNA foram utilizados 50 mg de folhas liofilizadas. O protocolo utilizado é apresentado a seguir, e baseou-se no apresentado por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações sugeridas por Catalan et al. (1997) para a espécie *Esenbeckia leiocarpa*.

O processo de extração foi iniciado através da maceração do tecido vegetal, com o auxílio de nitrogênio líquido para promover o rompimento das paredes celulares.

A seguir, o tecido macerado foi ressuspensionado em 0,7 ml de tampão de extração CTAB a 2%, em banho-maria a 62°C por 30 minutos.

Finalizada esta etapa, foram realizadas duas lavagens com o mesmo volume de clorofórmio, seguidas da centrifugação deste volume e pipetagem do sobrenadante. O DNA foi precipitado desta solução através da adição de 0,45 ml de álcool isopropílico, que durante 15 a 30 minutos permaneceu sob uma temperatura de -18 °C; sendo posteriormente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. Este processo repetiu-se mais duas vezes: a primeira com etanol 70% e a segunda com etanol absoluto.

Após o processo de extração, a porção líquida foi descartada e o "pellet" foi ressuspensionado em tampão TE e mantido em freezer a -20°C.

### **3.2.3 Quantificação do DNA**

A quantificação do DNA, presente nas amostras, foi realizada através de uma eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo, numa mini cuba sob 80 V e 120 mA durante 45 min. Após esse processo, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e quantificado através da comparação com amostras de DNAs de quantidades previamente conhecidas (DNA  $\lambda$ ), colocado no gel juntamente com as amostras nas quantidades 50, 100, 200, 400 ng.

### **3.2.4 Seleção de primers**

Foram testados 40 primers dos kits AA e AB da Operon technologies. Destes foram selecionados 12 primers. O resultado do "screening" dos primers foi semelhante ao obtido por Catalan et al. (1997).

### 3.2.5 Reações de amplificação

Foram feitas duas repetições das reações para servirem de controle das amplificações realizadas (Tabela 4). Em cada poço da placa, foram adicionados 10ul da reação RAPD e 3ul de DNA, submetidos ao termociclador, sob as condições de amplificação apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4. Reagentes e concentrações utilizados nas amplificações para obtenção dos RAPDs.

Reagente	Concentração	ul/reação
Água autoclavada	---	3,42
Tampão PCR	1x	1,30
DNTP's	200 mM	1,04
BSA	10 mg/ml	1,04
Primer	0,2 uM	3,00
Taq	1 unidade	0,20
DNA	10 ng	3,00

Tabela 5. Programa utilizado para as reações de amplificação em termociclador.

Ciclos	Tempo de duração	Temperatura
1	1 min	91°C
10	20 s	91°C
	30 s	42°C
	1 min	71°C
40	20 s	91°C
	15 s	42°C
	1 min	71°C
1	3 min	71°C

### 3.2.6 Análise dos fragmentos de DNA amplificados em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5%. Foi utilizado como tampão de cuba uma solução de TBE 0,5X, no qual o gel foi imerso a 1,5 cm da superfície para evitar super aquecimento do gel e, conseqüentemente, bandas com arraste ou deformações. As condições de corrida foram 120V e 200 mA durante aproximadamente quatro horas e 30 minutos ou até que o tampão de carregamento atingisse 10 cm de corrida, distância necessária para a separação efetiva dos fragmentos e leitura correta dos polimorfismos. Foram inseridos no gel fragmentos de tamanho conhecido (Kb ladder) nos poços adjacentes às amostras, a fim de auxiliar no diagnóstico do tamanho dos fragmentos amplificados.

Após a corrida, os géis foram visualizados sob um transluminador UV e fotografado com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao computador, utilizando o programa Kodak Digital Science.

### 3.2.7 Análise dos dados RAPD

Polimorfismos de fragmentos de RAPD são visualizados como presença e ausência de bandas em um gel de eletroforese, podendo ser facilmente interpretados e convertidos em dados diagnósticos de homologia molecular entre indivíduos. Nem todos os fragmentos polimórficos amplificados foram usados como marcadores, sendo aproveitados apenas os mais robustos e de melhor resolução. A interpretação dos dados foi feita de maneira binária (0= ausência e 1=presença), devido à natureza dominante dos dados.

O programa TFPGA 1.3 -Tools for population genetic analysis (Miller, 1997) foi utilizado para obtenção das estimativas das frequências alélicas, índices de diversidade, estatísticas F e distância genética de Nei (1972, 1978). Tendo em vista a natureza dominante dos dados, esse programa pressupõe, para os cálculos das estimativas das frequências alélicas, que os locos estejam em Equilíbrio de Hardy–Weinberg. As frequências alélicas foram estimadas a partir da raiz quadrada da frequência do genótipo nulo (recessivo).

Os índices de diversidade, heterozigosidade observada e esperada, foram calculados para cada loco, além da média de todos os locos. Os valores de heterozigosidade observada foram obtidos pela média do número de genótipos heterozigotos em relação ao total de genótipos em cada loco e para a média dos locos. A heterozigosidade esperada, ou diversidade gênica, foi estimada pela média dos  $H_e$  nos locos, obtida a partir da expressão sugerida por Nei (1978).

O programa TFPGA utiliza o método de Weir & Cockerham (1984) para o cálculo das estatísticas F, utilizando a terminologia de Weir (1996). Neste caso, os coeficientes de endogamia  $f$  e  $F$  correspondem aos  $F_{is}$  e  $F_{it}$  de Wright, enquanto  $\theta$  corresponde às estimativas de  $F_{st}$ . No entanto, para marcadores dominantes como o RAPD, as estimativas de  $\theta$  calculadas pelo TFPGA são

realizadas sob a pressuposição da existência de equilíbrio para os dados examinados, sendo que os valores de  $f$  e  $F$  são considerados iguais a zero.

Nas análises de variabilidade genética inter e intrapopulacional, foi utilizado o programa AMOVA-PREP (Miller, 1998), que automatiza o processo de preparação dos arquivos provenientes de marcadores dominantes como RAPD e AFLPs para que a análise possa ser realizada pelo programa WINAMOVA 1.5 - Análise de Variância Molecular - (Excoffier, 1992).

Excoffier (1992) desenvolveu o programa para estudar a variação molecular somente para dados RFLPs, onde informações de divergência de haplótipos são incorporadas numa análise de variância derivada de uma matriz de quadrados das distâncias entre todos os pares de haplótipos. Esta análise de variância molecular gera estimativas de componentes de variância e valores análogos aos das estatísticas  $F$ , que refletem a correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis de subdivisão hierárquica.

Huff et al. (1995) aplicaram pela primeira vez o programa WINAMOVA para marcadores dominantes em seu trabalho sobre a variação RAPD dentro e entre populações naturais de *Buchloe dactyloides*. A partir de então, uma série de trabalhos, utilizando marcadores RAPD, vem seguindo este programa para obter estimativas de variabilidade entre e dentro de populações. Neste trabalho, utilizamos a WINAMOVA 1.5 para decompor os componentes de variância em diversos níveis hierárquicos.

### **3.3 Análise da distribuição da variabilidade genética através da metodologia isoenzimática**

Visando a caracterizar a variabilidade genética de duas subpopulações naturais de *E. leiocarpa*, foram utilizados marcadores isoenzimáticos seguindo as recomendações de Alfenas (1991).

### **3.3.1 Coleta de material**

Foram coletados tecidos foliares de 53 indivíduos da subpopulação 1 de Ibicatu e de 53 indivíduos da subpopulação 1 de Prainha. As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos fechados com fita adesiva e colocados em caixa de isopor, contendo barras de gelo. O material foi levado para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA) e acondicionado em geladeira por, no máximo, 24 horas.

### **3.3.2 Extração das enzimas**

A extração das enzimas empregou aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar por amostra, macerado com o auxílio de um bastão de vidro, com adição de nitrogênio líquido e de duas gotas de solução de extração (Tabela 6).

A solução extraída individualmente para cada indivíduo foi absorvida em "wicks" (pedaços de papel-filtro nas dimensões 6 x 10mm), que foram congelados em freezer a -80°C para serem posteriormente utilizados nas corridas de eletroforese de isoenzimas.



Tabela 6. Composição da solução de extração utilizada nas análises isoenzimáticas.

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO	QUANTIDADE
Fosfato de sódio	0,034 M	0,6 g
Sacarose	0,02 M	7 g
PVP-40	2,56 %	2,56 g
DTT	3 mM	50 mg
L-ac.ascórbico	5,7 mM	100 mg
Dieca	5,3 mM	100 mg
Bissulfito de sódio	2,6 M	50 mg
Borax	2,5 mM	50 mg
Polietilenoglicol	—	1 g
Água deionizada	—	100 mL

### 3.3.3 Corridas de eletroforese

A eletroforese de isoenzimas foi realizada em gel horizontal de amido, (Tabela 7), utilizando o tampão CM (Tabela 8).

Cada gel acondicionou amostras de 20 indivíduos, sendo nas duas extremidades acondicionados “wicks” embebidos em solução de bromofenol a 0,1%, objetivando marcar a distância de migração das isoenzimas durante a corrida.

Durante a migração, os géis foram mantidos em geladeira com uma placa de gelo sobre o gel, o que acarretava uma temperatura de aproximadamente 5°C. Após 15 minutos do início da corrida, os “wicks” eram retirados. A duração das corridas era de aproximadamente cinco horas, quando o marcador de bromofenol atingia aproximadamente 9 cm.

Tabela 7. Composição do gel.

Penetrose	30 g
Amido	16 g
Tampão de cuba (diluído 1:20)	375 ml
Água deionizada	25 ml

Tabela 8. Tampão de cuba CM.

REAGENTE	QUANTIDADE
Ácido cítrico	8,4 g
Água deionizada	1 L

### 3.3.4 Coloração dos géis

A coloração dos géis foi feita utilizando cinco sistemas enzimáticos: PGM, MDH, ACP, PO e PGI. Os protocolos encontram-se listados em Alfenas (1991).

As fatias dos géis coloridas para os diversos sistemas enzimáticos foram mantidas no escuro em estufa a uma temperatura de 37°C até sua revelação.

### 3.3.5 Interpretação inicial dos zimogramas

A interpretação inicial dos zimogramas foi feita logo após a revelação das isoenzimas. Para isso os géis foram transparentizados e suas bandas desenhadas em filme plástico com caneta de retroprojeter.

A distinção dos locos aparentes foi a mesma definida por Reis (1993) e Seoane (1998): em cada região do zimograma que apresente um comportamento aparentemente independente dos demais e que possa ser

interpretado geneticamente, ou que apresente uma segregação mendeliana aparente, definiu-se como loco.

### **3.3.6 Análise dos dados**

A partir da interpretação dos zimogramas, foram calculadas para as duas subpopulações as frequências alélicas, índices de diversidade, distâncias genéticas, UPGMA e coeficientes de coancestralidade através do programa TFPGA.

O programa TFPGA utiliza o método de Weir & Cockerham (1984) para o cálculo das estatísticas  $F$ , utilizando a terminologia de Weir (1996). Neste caso, os coeficientes de endogamia  $f$  e  $F$  são correspondentes aos  $F_{is}$  e  $F_{it}$  de Wright, enquanto  $\theta$  corresponde às estimativas de  $F_{st}$ .

Para o teste de aderência ao Equilíbrio de HW, foi utilizado o teste exato descrito por Haldane (1954).

## **3.4 Comparação entre as duas metodologias**

### **3.4.1 Metodologia RAPD e isoenzimática**

Para a comparação entre as duas metodologias, foram analisados 53 indivíduos adultos pertencentes à subpopulação 1 de Prainha e 53 indivíduos da subpopulação 1 de Ibicatu, totalizando 106 indivíduos analisados, de acordo com a metodologia isoenzimática e RAPD exposta nos itens acima.

### **3.4.2 Análise de dados**

Os dados RAPD e isoenzimáticos foram analisados através do programa TFPGA que permitiu analisar ambos os tipos de marcadores.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Distribuição da variabilidade genética em quatro fragmentos florestais estimada através de marcadores RAPD**

#### **4.1.1 Polimorfismos de marcadores RAPD**

O procedimento de extração de DNA utilizado permitiu a obtenção de DNA genômico total em qualidade e quantidade ideais para geração de marcadores RAPD. Foi utilizado um total de 12 primers do Kit AA e AB que, ao término das análises, apresentaram 24 marcas polimórficas com boa resolução. Os resultados obtidos estão de acordo com o estudo de Catalan et al., 1997 que indicaram um número reduzido de marcas polimórficas (Tabela 9).

Tabela 9. Número de marcadores RAPD analisados por primer.

Primer	Número de marcadores RAPD analisados
OP AA 7	1
OP AA 11	3
OP AA 16	2
OP AA 17	3
OP AA 18	1
OP AA 19	2
OP AB 1	2
OP AB 2	1
OP AB 5	3
OP AB 7	2
OP AB 11	2
OP AB 18	2
Total	24

Dois aspectos fundamentais da técnica de RAPD definiram o critério de seleção de marcadores RAPD. O primeiro levou em consideração que a técnica PCR é uma ferramenta poderosa para detecção de polimorfismos, porém, muito sensível à alterações nas condições de amplificação. A outra questão é a competitividade entre os fragmentos amplificados nos diversos sítios do genoma.

Como sugere Ferreira & Grattapaglia (1995), para controlar a sensibilidade da técnica de PCR pode se optar por manter constantes as condições de concentrações de reagentes e o perfil térmico do programa do termociclador. Isso otimiza as condições de reação, principalmente no que se refere à qualidade e quantidade do DNA genômico, repetindo algumas extrações de DNA dos mesmos indivíduos para que sirvam de controle.

No tocante à questão da competitividade entre os fragmentos amplificados, o mesmo autor esclarece que todos os sítios competem por substrato (DNTP) e enzima (Taq) durante o PCR e, portanto, tendem a ser amplificados com eficiências diferentes. Isto resulta em bandas de intensidades distintas, quando coradas com brometo de etídeo e visualizadas sob luz UV. Portanto, a maior ou menor intensidade com a qual uma determinada banda RAPD é visualizada é reflexo do grau de competitividade do sítio. Quanto mais competitivo o sítio, mais interpretável, reproduzível e robusto será aquele marcador em ensaios sucessivos.

A grande vantagem da técnica, e que deve ser explorada, é que muitos marcadores são gerados, o que permite uma grande flexibilidade para a seleção daqueles marcadores mais robustos. Deste modo, julga-se prudente manter uma alta estringência em relação aos fragmentos amplificados em um gel, o que justifica o menor número de sítios considerado como marcador, quando comparado com outros trabalhos.

O conceito de selecionar apenas alguns fragmentos como marcadores a partir de um gel com muitos fragmentos amplificados vem sendo usado, tendo em vista o ressaltado por Ferreira & Grattapaglia (1995) e seguido por Reis, (1999). Esses autores afirmam que, ao considerar-se todas as bandas visualizáveis no gel como marcadores, podem ocorrer problemas de reproducibilidade em ensaios posteriores.

Deste modo, adotou-se um nível alto de estringência na seleção de quais bandas utiliza-se, buscando não apenas o polimorfismo, mas também aquelas mais intensas e robustas, repetíveis em ensaios sucessivos. Essas medidas são consideradas controles suficientemente eficazes para verificar se os resultados obtidos são adequados para que a transferibilidade dos resultados em dados seja consistente.

Portanto o baixo número de marcadores RAPD, justifica-se por dois fatores principais: primeiro, devido ao critério de alta estringência que leva em consideração apenas as bandas mais intensas e robustas e, segundo, aos

primers testados e selecionados que no “screening” apresentaram um nível relativamente baixo de polimorfismo (aproximadamente 4 marcadores por primer)

Foi efetuada a avaliação dos erros associados a estimativas de distância genética através do procedimento de “bootstrap”, com um número variável de marcadores através do programa DBOOT 1.0 (Coelho, 2000). O nível de erro estimado pelo programa determina a confiabilidade das estimativas obtidas a partir do número de marcadores analisados. A estimativa de erro em no experimento foi de 13,92 % com quartil inferior de 11,69 % e quartil superior de 16,10 %. O autor recomenda que para garantir a confiabilidade das estimativas os valores de erro devem ser inferiores a 15%. Deste modo, verificou-se que este baixo número de locos provavelmente não afetará de forma significativa as estimativas

Segundo Chambers (1994) é importante considerar que o número de produtos RAPD é único e pode ser considerado diagnóstico de uma dada espécie. Esta afirmação confirma-se através da literatura; onde foram encontrados artigos nas quais as análises de RAPD foram feitas utilizando-se um número baixo de marcadores, em estudos com populações naturais de várias espécies (Ayres et al. (1999); Isabel & Beaulieu (1995); Aagard et al.(1998) e Dawson et al.,1995).

#### 4.1.2 Índices de diversidade

Tabela 10. Índices de diversidade encontrados através de marcadores RAPD em oito subpopulações naturais de *E. leiocarpa*.

Subpopulação	N	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	F
Ibicatu 1	53	0,4162	0,4122	0,0096
Ibicatu 2	25	0,3956	0,3876	0,0202
Prainha 1	53	0,4667	0,4624	0,0092
Prainha 2	24	0,4959	0,4856	0,0207
Caetetus 1	46	0,4421	0,4373	0,0108
Caetetus 2	33	0,4629	0,4559	0,0151
Genebra 1	23	0,4257	0,4164	0,0218
Genebra 2	12	0,4121	0,3949	0,0417
<i>E. leiocarpa</i>	270	0,4404	0,4339	0,0186

n: tamanho médio da amostra;  $\hat{H}_o$ : Heterozigiosidade observada;  $\hat{H}_e$ : Heterozigiosidade esperada

A subpopulação 2 de Prainha apresentou os maiores valores de heterozigiosidade esperada e observada; os menores valores ficaram por conta da subpopulação 2 de Ibicatu. Apesar disso, a maioria dos valores de heterozigiosidade encontrados é próxima um do outro, com estimativas de  $H_e$  variando de 0,3956 a 0,4979.

De modo geral, os níveis de heterozigiosidade esperada e observada apresentaram valores relativamente altos quando comparados com os obtidos para outras espécies arbóreas, como apresentado na Tabela 1.

#### 4.1.3 Estatística F

Devido à dominância do marcador, foi assumida a aderência às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta pressuposição acarreta em



considerar que  $F$  e  $f$  são iguais a 0, restando apenas as estimativas de  $\theta$  através dos valores de  $\theta_s$  que indicam a diferenciação das populações dentro dos fragmentos e  $\theta_p$ , que indica a diferenciação entre os fragmentos.

Para todos os locos, as estimativas de  $\theta_s$  foram 0,0923 e de  $\theta_p$  foram de 0,0325. Estes valores demonstraram pouca diferenciação entre fragmentos, contrapondo-se a uma diferenciação um pouco maior entre populações contidas num mesmo fragmento.

#### 4.1.4 Distribuição da variabilidade genética

Tabela 11. AMOVA dos dados de marcadores RAPD de indivíduos de *E. leiocarpa* (a) em quatro fragmentos florestais e (b) em oito subpopulações.

F.V	G.L	Comp.Var.	% Total
a. Entre fragmentos	3	0,064	2,33
b. Entre subpopulações	7	0,212	7,73
Dentro de subpopulações	262	2,475	89,93

A Tabela 11 mostra uma tendência da variabilidade genética ser maior entre indivíduos do que entre subpopulações. Este dado vem somar-se a uma série de trabalhos com espécies arbóreas tropicais que afirmam que a maior parte da variabilidade genética ocorre em nível intrapopulacional.

Lovelles & Hamrick (1984) afirmam que muitas espécies arbóreas possuem efetivos meios de dispersão de genes e, com isto, mantêm altos níveis de variação genética dentro de populações, com pouca diferenciação entre populações.

*E. leiocarpa* é uma espécie tropical de fecundação predominantemente cruzada, onde provavelmente o fluxo gênico atua tendendo a diminuir a

diferenciação entre as populações de um mesmo fragmento. Tendo em vista que o polinizador é um animal de vôo curto (Crestana et al.,1982), acredita-se que o fluxo gênico responsável pela homogenização das subpopulações seria via sementes, através de pássaros, comprovando a existência de diplocoria.

#### 4.1.5 Distâncias genéticas de Nei

Tabela 12. Distâncias genéticas de Nei (1972;1978) para oito subpopulações de *E. leiocarpa*.

POP	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	0,1472	0,0339	0,0860	0,1108	0,1135	0,1928	0,1963
2	_____	0	0,0787	0,0503	0,1933	0,1323	0,1752	0,1654
3	_____	_____	0	0,0384	0,0551	0,0467	0,0890	0,1048
4	_____	_____	_____	0	0,0933	0,0630	0,0912	0,0938
5	_____	_____	_____	_____	0	0,0355	0,0720	0,0853
6	_____	_____	_____	_____	_____	0	0,0890	0,1091
7	_____	_____	_____	_____	_____	_____	0	0,0235
8	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	0

Populações: 1=Ibicatu pop 1 / 2=Ibicatu pop 2 / 3=Prairha pop1 / 4=Prairha pop2 / 5=Caetetus pop1 / 6=Caetetus pop 2 / 7=Santa Genebra pop 1 / 8=Santa Genebra pop 2

As maiores distâncias foram encontradas entre as subpopulações 1 de Ibicatu e as subpopulações 1 e 2 de Santa Genebra, que foram da ordem de 0,1963 e 0,1928. As que apresentaram menores distâncias foram as subpopulações pertencentes ao fragmento Santa Genebra ( $d=0,0235$ ).

Na Figura 4 é apresentado o dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean)

para as distâncias de Nei (1978), conforme descrito por Sneath & Sokal (1973) através do programa TFPGA.

O dendrograma (Fig.1A) demonstra que os marcadores RAPD foram capazes de detectar agrupamentos das subpopulações em populações (fragmentos), mostrando coerência em relação à distribuição geográfica das subpopulações dentro dos fragmentos. A maioria das subpopulações que integram o mesmo fragmento são as mais próximas geneticamente (exceto as subpopulações pertencentes à Ibicatu), o que sugere a existência de fluxo gênico entre as subpopulações de um mesmo fragmento, distribuindo a variabilidade entre os indivíduos das subpopulações.

## **4.2 Distribuição da variabilidade genética em 2 populações de *E. leiocarpa* detectada através de métodos isoenzimáticos**

### **4.2.1 Polimorfismo enzimático**

Foram selecionados cinco sistemas enzimáticos onde foram encontrados oito locos, sendo seis polimórficos (Mdh-2, Mdh-3, Pgi-1, Acp-1, Acp-2, Po-1) e dois monomórficos (Mdh-1, Pgm-1). Os indivíduos pertencentes à subpopulação 1 de Ibicatu apresentaram um total de 19 alelos, enquanto a subpopulação 1 de Prainha apresentou 18 alelos.

Na Figura 2A são apresentados os esquemas dos zimogramas para cada sistema enzimático.

#### 4.2.2 Freqüências alélicas

Tabela 13. Freqüências alélicas encontradas nos fragmentos Ibicatu e Prainha para a espécie *E. leiocarpa*.

Loco	Alelos	Freqüência alélica	
		Ibicatu	Prainha
Pgm-1	Alelo1	1	1
Acp-1	Alelo1	0,388	0,096
	Alelo2	0,472	0,778
	Alelo3	0,138	0,125
Acp-2	Alelo1	0,574	0,461
	Alelo2	0,277	0,375
	Alelo3	0,148	0,163
Mdh-1	Alelo1	1	1
Mdh-2	Alelo1	0,444	0,721
	Alelo2	0,370	0,153
	Alelo3	0,185	0,125
Mdh-3	Alelo1	0,416	0,288
	Alelo2	0,444	0,557
	Alelo3	0,138	0,153
Po-1	Alelo1	0,361	0,269
	Alelo2	0,629	0,730
	Alelo3	0,009	0
Pgi-1	Alelo1	0,472	0,394
	Alelo2	0,527	0,605

Dos oito locos analisados, apenas dois apresentaram-se monomórficos para ambas as populações. A distribuição das frequências foi semelhante na maioria dos locos, sendo que, em todos os locos, o alelo de maior frequência não variou entre as subpopulações.

As frequências alélicas demonstraram a completa fixação para alguns locos como Pgm-1 e Mdh-1 em ambas as populações e apenas a subpopulação de Iticatu mostrou possuir um alelo exclusivo ( alelo 3, Po-1).

#### 4.2.3 Índices de diversidade

Tabela 14. Índices de diversidade genética dos indivíduos adultos em duas subpopulações naturais de *E. leiocarpa*.

Subpopulação	n	P	A	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	F
Prainha	53	75%	2,250	0,338	0,363	0,068
Iticatu	53	75%	2,375	0,444	0,427	-0,039
Média	—	75%	2,312	0,391	0,395	0,010

P: porcentagem de locos polimórficos (P=0,95); A: número médio de alelos/loco;  $H_o$ : heterozigosidade média observada;  $H_e$ : heterozigosidade média esperada; F: índice de fixação

Comparando os resultados médios obtidos, observa-se altos valores de heterozigosidade com pouca variação entre  $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$ . A porcentagem de locos polimórficos foi bastante alta (75%) e não variou entre as populações. Os locos segregam de um a três alelos, sendo que o número médio de alelos por loco para as duas populações foi de 2,31, um valor relativamente alto. De modo geral, os índices expressivos de riqueza alélica e diversidade gênica mostram que a variabilidade genética nas populações de *E. leiocarpa* é em geral bastante alta. Os índices de fixação mostram pouca endogamia presente nas subpopulações. Os dados de fixação sugerem que a espécie que apresenta

distribuição agregada deva possuir mecanismos evolutivos que evitem a endogamia.

Crestana et al. (1982) detectaram mecanismos de autoincompatibilidade para a espécie. Em concordância Seoane (1998), detectou altas taxas de cruzamento e apenas uma pequena porção de cruzamentos entre aparentados. Possivelmente estes fatores sugerem uma forte seleção contra indivíduos aparentados, resultando em baixos níveis de endogamia para a espécie.

Na subpopulação Prainha, os valores de heterozigosidade esperada foram mais altos em relação à heterozigosidade observada refletindo nos baixos índices de fixação encontrados. A subpopulação Prainha apresentou menor heterozigosidade e maior índice de fixação em relação à Ibicatu. O histórico deste fragmento mostra que o mesmo foi exposto a uma intensa exploração madeireira cerca de 30 anos atrás, onde poucos indivíduos foram preservados por estarem em locais de difícil acesso.

O reduzido número de indivíduos remanescentes da população original de Prainha pode ter sido um dos fatores responsáveis pela menor heterozigosidade encontrada nesta população, quando comparada à Ibicatu (que representa um fragmento onde a exploração madeireira foi menos intensa e mais antiga).

Na população de Ibicatu a situação se inverte; os valores de heterozigosidade esperada foram mais baixos, em relação à heterozigosidade observada, refletindo nos índices de fixação negativos encontrados, que indicaram um leve excesso de heterozigotos.

Os resultados obtidos por Seoane (1998) em Ibicatu para os índices de diversidade diferiram dos obtidos neste trabalho, havendo concordância apenas nos valores de  $F$ . Este autor obteve valores em torno de 0,175 para  $\hat{H}_o$  e 0,180 para  $\hat{H}_e$ , valores muito abaixo dos obtidos neste trabalho. Na tabela 15 é possível visualizar a comparação entre os dois trabalhos.

Tabela 15. Comparação entre o trabalho de Seoane (1998) e Castellen (2000) amostrando indivíduos adultos de *Esenbeckia leiocarpa* em Ibicatu. Piracicaba. ESALQ/USP, 2000.

Autor	Seoane, 1998	Castellen, 2000
Número de locos	11	8
Locos monomórficos	3	2
Locos polimórficos	8	6
Sistemas utilizados	6 (SKDH, PGM, 6PGDH, 5 (PGM, PGI, MDH, PO e PGI, IDH e MDH)	ACP)
Amostragem	20 indivíduos adultos de cada subpopulação.	53 indivíduos adultos de cada subpopulação.
A	1,73	2,31
$\hat{H}_e$	0,180	0,427
$\hat{H}_o$	0,175	0,444
F	0,028	-0,039

As diferenças encontradas quanto aos valores de heterozigidade esperada e observada podem ser justificadas por dois fatores: o primeiro seria a amostragem, completamente distinta entre os dois trabalhos, onde foram amostrados diferentes indivíduos de diferentes subpopulações (inicialmente, neste trabalho, pretendia-se amostrar os mesmos indivíduos de Seoane (1998), no entanto, as marcações de campo já haviam sido perdidas); o segundo fator importante seriam os sistemas utilizados (apenas três sistemas foram utilizados em ambos os trabalhos - PGI, PGM e MDH ).

Segundo Simon & Archie (1985), a escolha dos locos afeta as estimativas obtidas, pois o comportamento específico destes locos (distintas taxas de mutação e número de locos) decorre do tamanho e da forma da enzima. Portanto o autor considera que comparações entre trabalhos devem

ser tomadas com cautela, especialmente se envolvem poucos e diferentes locos. Outro aspecto citado pelo autor que pode afetar comparações é a inclusão ou não nas análises de locos monomórficos. Na medida em que um determinado número de sistemas aleatórios revela uma certa quantidade de locos monomórficos, há maior possibilidade de representatividade com a inclusão dos mesmos.

#### 4.2.4 Teste de adequação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 16. Teste de adequação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg loco a loco.

LOCO	P (PRAINHA)	P (IBICATU)
Pgm-1	—	—
Acp-1	0,0129	0,0957
Acp-2	1	0,7796
Po-1	0,0085	0,0309
Pgi-1	0,2848	1
Mdh-1	—	—
Mdh-2	0,4216	0,0441
Mdh-3	0,1793	0,7780

P: Probabilidade exata de Haldane, 1954

Através da Tabela 5, verifica-se que as subpopulações se ajustam às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg em 66,6% dos locos. Isto demonstra que as proporções se mantêm através de gerações, não havendo mudanças nas freqüências alélicas.

Resultado semelhante foi obtido por Seoane (1998) quando a maioria das populações estudadas apresentou aderência às proporções do Equilíbrio de HW.



#### 4.2.5 Estrutura genética

Através da análise de variância para cada alelo, foram obtidas estimativas para os coeficientes  $F$ ,  $f$  e  $\theta_p$ , como mostra a Tabela 16.

Tabela 17. Estimativas de  $f$ ,  $F$  e  $\theta_p$  para duas populações naturais de *E. leiocarpa*.

LOCO	$f$	$F$	$\theta_p$
Pgm-1	_____	_____	_____
Acp-1	-0,2238	-0,0415	0,1489
Acp-2	-0,1640	-0,1516	0,0106
Po-1	0,3563	0,3617	0,0085
Pgi- 1	0,0820	0,0839	0,0021
Mdh-1	_____	_____	_____
Mdh-2	0,0444	0,1369	0,0968
Mdh-3	0,0283	0,0424	0,0146
Total dos locos	0,0093 (IC)	0,0581 (IC)	0,0493 (IC)

I.C=95% obtido através de 10000 bootstraps

De modo geral, as estimativas dos coeficientes de endogamia nas subpopulações foram baixas. A endogamia total para o conjunto de subpopulações ( $F$ ) foi de 0,0581. Os baixos valores encontrados para esse coeficiente refletem os baixos valores de  $f$  e  $\theta_p$ , indicando que apenas uma pequena porção de endogamia foi gerada pelo efeito de deriva genética advinda da subdivisão.

As estimativas de endogamia devido à subdivisão ( $\theta_p$ ) sugerem que as duas subpopulações possuem pouca divergência ( $\theta_p=0,049$ ), apresentando

médio dentro das populações  $f$  (média de  $f=0,009$ ) sugerem a pouca incidência de endogamia devido ao sistema reprodutivo.

A alta variabilidade genética intrapopulacional e os valores encontrados através da análise de variância de frequências gênicas demonstram indícios da ausência de estruturação nas populações. Estes resultados aliados ao teste de adequação ao EHW indicam que a espécie adequa-se ao modelo panmítico.

Os resultados obtidos mostram concordância com os trabalhos de Seoane (1998) realizado com isoenzimas para a mesma espécie em Ibicatu e Caetetus. O autor citado estudou duas gerações da espécie e detectou, através da estimativa de fluxo gênico ( $N_m$ ), uma intensa troca gênica entre as subpopulações existentes dentro dos dois fragmentos: Ibicatu ( $N_m=4,40$ ) e Caetetus ( $N_m=1,16$ ).

O autor considera que estes valores indicam que o fluxo gênico dentro dos fragmentos é suficiente para prevenir a diferenciação por deriva genética. De forma concordante, o índice de fixação foi baixo, sugerindo uma tendência ao equilíbrio de HW. As estimativas demonstraram existir uma baixa endogamia nas populações, sugerindo que os pequenos desvios encontrados no teste de Equilíbrio seriam provenientes de fatores evolucionários como seleção favorável a algum tipo de genótipo.

O mesmo autor estimou a autocorrelação espacial através do índice  $I$  de Moran, utilizando o método de distâncias pré-estabelecidas. Os valores flutuaram em torno de 0, indicando que a distribuição dos genótipos é aleatória nas duas populações, o que confirma o fato das populações não estarem estruturadas.

Segundo Wright (1931), o cruzamento entre indivíduos aparentados e a autofecundação, ou a proximidade de genótipos similares decorrentes da dispersão de pólen ou sementes a curta distâncias, tende a ampliar a quantidade de homozigotos na população a partir da redução dos heterozigotos em nível local. A maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos mais

próximos tende a formar grupos ou subdivisões internas (demes panmíticas), reduzindo a proporção total de heterozigotos na população.

*E. leiocarpa* é um exemplar típico de espécie alógama, comum de distribuição agregada. Seus polinizadores são de vôo curto e a autocoria é tida como um dos métodos menos eficientes de dispersão. Este fato aliado à dinâmica demográfica da espécie permite supor, num primeiro momento, que as populações da espécie se enquadrariam ao modelo de populações sob o efeito de Wahlund. A espécie, no entanto, apresentou altos valores de heterozigozidade esperada e os valores da estatística F sugerem que as subpopulações não são endogâmicas e aderem às proporções de Equilíbrio de HW.

A história de vida de cada espécie é única e consiste na interação de inúmeros fatores em diferentes níveis, os quais podem afetar sensivelmente a variabilidade genética das populações das espécies.

Sendo as plantas organismos sedentários, a composição genética de indivíduos adultos pode refletir a seleção existente nos estágios iniciais de vida das plantas nas populações. É importante considerarmos que grande parte das plântulas produzidas pela espécie são predadas e não chegam à fase adulta. A redução da população de propágulos possivelmente possui um efeito importante sobre a variabilidade genética, porém este efeito deve ser aleatório. De qualquer forma, o desenvolvimento e recrutamento destas plantas, provavelmente, têm um certo componente seletivo. Deste modo, supõe-se que cruzamento entre vizinhos (indivíduos possivelmente geneticamente relacionados) pode ter um sucesso limitado na espécie, o que afeta de forma positiva os níveis de variabilidade.

Tendo em vista o que foi citado, podemos afirmar que seria extremamente interessante a possibilidade de serem realizados futuros trabalhos a respeito dos processos de pós-fertilização que verifiquem a existência de uma possível seleção pós-zigótica na espécie.

A fauna é outro fator importante na história de vida da espécie, caso considere-se que esta é responsável pela distribuição secundária dos frutos, implicando numa contribuição importante para a manutenção do fluxo gênico da espécie.

Comparando os resultados aqui obtidos com os observados para outras espécies arbóreas, a heterozigosidade esperada para a espécie se encontra entre os valores mais elevados. A alta diversidade é uma característica importante para qualquer espécie, tendo em vista a possibilidade da geração posterior poder apresentar novos recombinantes, permitindo a adaptação da espécie a microambientes e a manutenção da dinâmica populacional.

O padrão de variabilidade encontrado para a espécie assemelha-se ao encontrado em outra espécie tropical comum do sub-bosque: o palmito (*Euterpes edulis*). O palmito possui características ecológicas semelhantes ao guarantã como o fato de ser uma espécie comum de distribuição agregada, alógama onde a fauna é responsável pela dispersão secundária. Reis (1996) estudou a estrutura genética de sete populações de palmito através de marcadores isoenzimáticos onde os valores de heterozigosidade esperada indicaram um alto grau de diversidade para espécie ( $H_e$  variou de 0,405 a 0,493 para os adultos e 0,402 a 0,449 para as progênies).

O autor detectou um excesso de heterozigotos nos adultos na maioria das populações (fato semelhante ocorreu na população de Ibicatu), possivelmente em decorrência de efeitos de seleção em favor dos mesmos. Segundo o mesmo autor, o excesso de heterozigotos tem sido descrito em outras espécies tropicais como *Pithecellobium pedficelare*, *Bertholetia excelsa* (O'Maley et al., 1987; 1988) *Ceiba pentandra* (Murawsky & Hamrick, 1992) *Psychotria faxlucens* (Perez-Nasser et al., 1993), *Astrocarium mexicanum* (Eguiarte et al., 1993) e *Cecropia obtusifolia* (Alvarez-Buylla & Garay, 1994).

#### 4.2.6 Distâncias genéticas de Nei (1972, 1978)

A análise da distância genética de Nei para a população de Ibicatu, em relação à Prainha foi de 0,0395. Este valor é considerado baixo, mostrando pouca divergência entre as populações, fato coerente com os valores encontrados por  $\theta_p$  no item “Estrutura Genética”.

### 4.3 Comparação entre os valores obtidos através das duas metodologias

#### 4.3.1. Índices de diversidade

Tabela 18. Índices de diversidade obtidos para ambos os marcadores na subpopulação 1 de Ibicatu.

Ibicatu	RAPD	Isoenzimas
$\hat{H}_e$	0,416	0,427
$\hat{H}_o$	0,412	0,444

Tabela 19. Índices de diversidade obtidos para ambos os marcadores na subpopulação 1 de Prainha.

Prainha	RAPD	Isoenzimas
$\hat{H}_e$	0,4667	0,3638
$\hat{H}_o$	0,4624	0,3389

Os valores de heterozigosidade apresentados pelos marcadores RAPD foram semelhantes aos encontrados pelos marcadores isoenzimáticos na subpopulação 1 de Ibicatu. O marcador isoenzimático apresentou valores em torno de 2,5% maiores nas estimativas de  $H_e$  e 7,2% maiores nas estimativas

de  $H_o$ . Estes valores são considerados baixos, tendo em vista que apenas diferenças superiores a 15% têm sido consideradas significativas em outros trabalhos (Halden, 1996). Deste modo, os valores encontrados demonstram a existência de concordância entre os valores obtidos através dos dois marcadores.

No entanto, situação inversa ocorreu em Prainha, onde as estimativas obtidas através de RAPD foram maiores, bem como as diferenças encontradas entre os dois marcadores (22,04% nas estimativas de  $H_e$  e 26,7% nas estimativas de  $H_o$ ).

O fato das estimativas obtidas através de RAPD serem maiores que as isoenzimáticas tem sido citado na literatura, revelando que em casos de diferenças significativas entre os valores de heterozigosidade estimados, em geral, as estimativas obtidas via RAPD são maiores que as isoenzimáticas.

Quanto à diferença entre os valores obtidos através dos dois marcadores para a subpopulação 1 de Prainha, esta pode ter sido parcialmente causada por dois fatores principais: a dominância do marcador RAPD e a pressuposição de Equilíbrio de HW.

Se um loco é polimórfico com um alelo recessivo presente em baixa frequência, todas as cópias desse alelo estarão presentes em heterozigotos e se tornarão indetectáveis pelos ensaios RAPD, resultando em um loco tido como monomórfico, o que acarretará numa subestimativa dos parâmetros: P (porcentagem de locos polimórficos), A (número médio de alelos por loco) e  $H_e$  (heterozigosidade esperada). Outro aspecto da dominância é que os únicos locos monomórficos observados são aqueles que são monomórficos para o alelo dominante (presença de banda); porções do genoma que são monomórficas para o alelo recessivo (ausência de banda), não são observadas. Esta inabilidade de observar o loco monomórfico para um dos dois alelos irá resultar numa superestimativa de P, A e  $H_e$ .

O segundo fator diz respeito à pressuposição de Equilíbrio de Hardy-Weinberg feita para estimar  $H_e$  de dados RAPD. Apesar de muitas vezes os

locos isoenzimáticos mostrarem que certas populações estão em equilíbrio (o que torna a pressuposição razoável), existe sempre a possibilidade dos locos isoenzimáticos não serem representativos dos locos RAPD.

Além destes fatores, as diferenças entre os resultados podem simplesmente ser devido a diferentes capacidades dos dois marcadores de detectar a variabilidade genética.

Fornari et al. (1999) e Szmidt et al. (1996) obtiveram resultados similares aos deste trabalho. Em ambos os casos, os autores estudaram populações de uma mesma espécie, no entanto, algumas populações apresentaram diferenças significativas entre os parâmetros estimados a partir das duas metodologias.

Tendo em vista os resultados obtidos e os fatores expostos acima, conclui-se que os marcadores RAPD apresentaram certas limitações, inerentes à técnica, nas análises de populações quando comparados às isoenzimas. No entanto, nos casos onde estes fatores não atuaram de forma significativa, como em Ibicatu, os marcadores RAPD estimaram de forma eficaz os valores de heterozigidade. Deste modo, alguns autores julgam os marcadores RAPD como sendo mais adequados em estudos de "fingerprinting", onde se faz necessário um número maior de locos, ampliando a cobertura genômica.

#### 4.3.2 Distâncias genéticas estimadas através de isoenzimas e RAPD

Tabela 20. Distâncias genéticas de Nei (1972, 1978) obtidas através dos dois marcadores.

Isoenzimas	RAPD
0,0395	0,0339

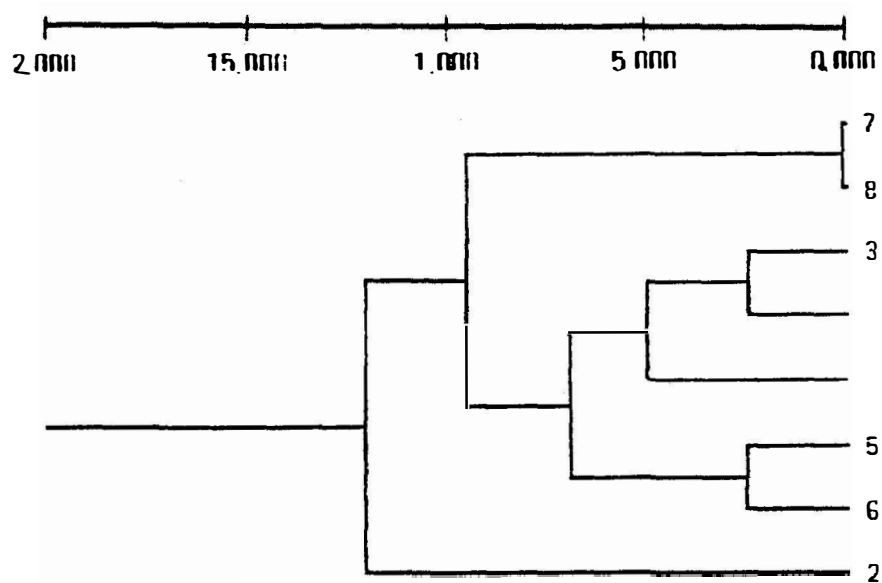
As estimativas de distância genética de Nei através de isoenzimas foram cerca de 14,17% mais altas. Este valor indica que a divergência entre as estimativas ainda encontra-se em um nível aceitável, apesar de estar próxima do valor máximo recomendado.



## 5 CONCLUSÕES

- As populações apresentaram altos níveis de variabilidade genética tanto através do método isoenzimático quanto através de marcadores RAPD, quando comparadas com outras espécies arbóreas tropicais.
- A maior parte da variabilidade encontra-se em nível intrapopulacional, confirmando o trabalho de Hamrick (1989) que concluiu que espécies perenes, de ciclo de vida longo, reprodução sexuada por fecundação cruzada, de estágios avançados de sucessão, apresentam maior parte da variabilidade dentro de suas populações do que entre populações.
- A maioria dos locos adere às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Os valores de endogamia nas populações são baixos.
- Os resultados demonstraram que existe concordância entre os parâmetros obtidos através das duas metodologias, exceto em relação às estimativas de heterozigosidade.

## ANEXOS



Populações: 1=Ibicatu pop 1 / 2=Ibicatu pop 2 / 3=Prainha pop1 / 4=Prainha pop2 / 5=Caetetus pop1 / 6=Caetetus pop 2 / 7=Santa Genebra pop 1 / 8=Santa Genebra pop 2

Figura 1A - Dendrograma baseado no método UPGMA.

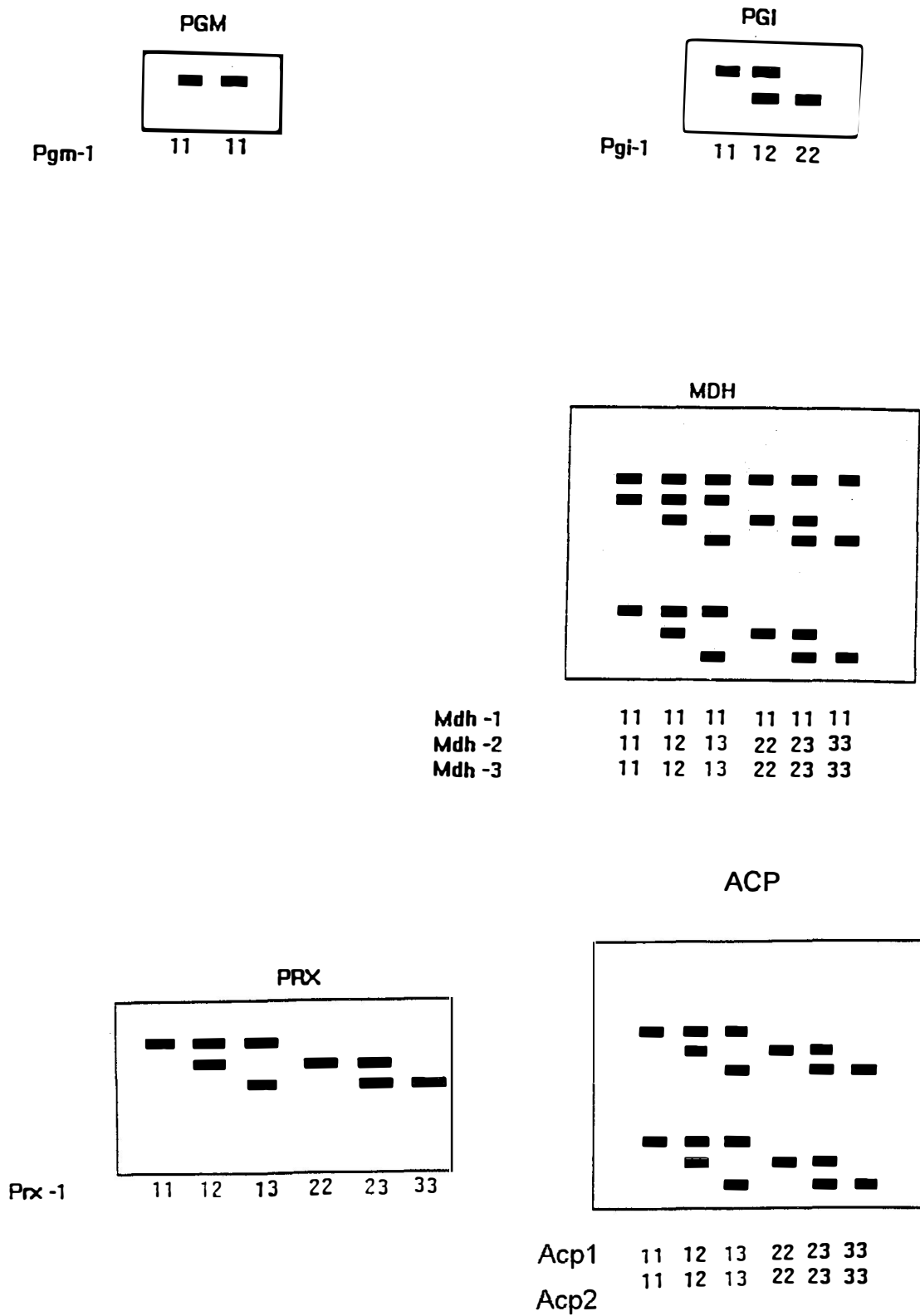


Figura 2A - Esquema dos zimogramas referentes aos sistemas MDH, ACP, PO, PGI, PGM obtidos para *Esenbeckia leiocarpa*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGARD, J.E.; KRUTOVSKII, K.V; STRAUSS S.H. RAPD and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of douglas-fir. **Heredity**. v.81, p. 69-78, 1998.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- ALMEIDA JÚNIOR, J.S. Florística e fitossociologia de fragmentos florestais da Floresta Estacional Semidecídua 1999, Viçosa, 149p. Dissertação de Mestrado, UFV.
- ALVAREZ BUYLLA, E.R & GARAY, A. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer species. **Evolution**, v.48, n.2, p.437-53, 1994.
- AYRES, D.R., RYAN, F. J., Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. **American Journal of Botany**. v.86, p.344-353, 1999.
- BAWA, K.S.; ASHTON, P.S. Conservation of rare tree in tropical Rain Forests: a genetic perspective. In: FALK, D.D. & HOLSINGER, K.E. (eds). **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p.62-71.
- BDT - Base de dados tropicais. [http:// www.bdt.org.br/ mata.atlantica/ flora/ caetetus](http://www.bdt.org.br/mata.atlantica/flora/caetetus), 02/02/99.

- BIERREGARD JÚNIOR, P.O.; LOVEJOY, T.E.; KAPOS, V.; SANTOS, A.A. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. **Bioscience**, v.42, p.859- 866, 1992.
- CATALAN, P.; AMARAL, W.A.N. **Uso de RAPD para estudos genéticos de populações de *Esenbeckia leiocarpa***. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997. Relatório técnico Fapesp.
- CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; SPRENT, J.I.; SIMONS, A.J.; POWELL, W. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers **Heredity**, v. 69, p.465-472, 1994.
- CHONG, W. Condição nuclear, obtenção de mutantes e perfil de RAPD no isolamento ma12 de *Metarhizium amisopliae*. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, Campinas, 1994. **Programa de Resumos** Campinas, 1994
- CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v.30, n° 12, p. 814-818, 1980.
- COCKERHAM, C.C. & WEIR, B.S. Correlations and descendent measures: drift with migration and mutation. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.84, p.8512-4, 1987.
- COCKERHAM, C.C. & WEIR, B.S. Estimating f-statistic for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-70.
- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, p.72-84, 1969.

- COELHO, A G.S. **DBOOT Versão 1.0**. Avaliação dos erros associados a estimativas de distância genética através do procedimento de bootstrap, com um número variável de marcadores. Software distribuído pelo autor, 2000
- COSTA, L.G.S. Estrutura e dinâmica de um trecho de mata mesófila semidecídua na Estação Ecológica de Ibicatu, Piracicaba, SP. Piracicaba, 1992, 137p. Tese de Mestrado – ESALQ/ USP
- COTRIM, H.; SILVA, P; SALOMÉ PAIS, H. A. Biologia Molecular na conservação biológica: O caso RAPD em *Silene rothmaleri*. In: **Biotecnologia Molecular**, 1998
- CRESTANA, C.S.M.; DIAS, I.S. & KAGEYAMA, P.Y. Biologia floral do Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.); Silvicultura. In: 4º CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 1982. **Anais**. 1982. v.28, p.35-38.
- DAWSON, I.K.; SIMONS, A.; WAUGH, R.; POWELL, W. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR based assays **Heredity**, v.74, p.10-18, 1994.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v.12, p.13-15, 1987.
- DURIGAN, G. Florística, fitossociologia e produção de folheto em matas ciliares da região oeste do Estado de São Paulo. Campinas, 1994. 149 p. Dissertação de Mestrado - Unicamp.

- EGUIARTE L.E.; PEREZ-NASSER, N.; PINERO. D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astricarium mexicanium* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, v. 69, p. 217-28, 1992.
- ELLSTRAND, N.C. & ELLAN, D.R. Population genetic consequences of small population sizes implication for plants conservation. **Annual Review on Ecological systematics**, v.24, p. 217-242, 1993.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.
- EXCOFFIER, L.; WINAMOVA. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Carouge, Switzerland. 1993
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1995. 220p.
- FORNARI, B.; TAURCHINI, D; VILLANI, F. Genetic structure and diversity of two Turkish *Castaneae sativa* mill. Populations investigated with isozyme and RAPD polymorphisms. **J. Genet and Breed.** 53:315-325. 1999.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Trad. Mario de Vivo. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPQ, 1992. 646p.



- GANDARA, F.B. Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrella fissilis* Vell. (Meliaceae). Campinas, 1996, 69p. Dissertação de Mestrado – Unicamp.
- HALDEN, C.; HANSEN, M.; NILSSON, N.O.; HJERD, I.N.A. Competition as a source of errors in RAPD analysis **Theoretical and applied genetics** v.93, p. 1185-1192, 1996.
- HAMRICK, J.L.; LINHEART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.10, p.173-200, 1979.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L. (eds) **Genetics and conservation**. Menlo Park: The Benjamin / Cummings publishing Company, 1983.
- HAMRICK, J.L. & LOVELLES, M.D. The genetic structure of tropical tree population: associations with reproductive biology. In: BOOCK, J.H. LINHEART; Y.B. (eds). **The evolutionary ecology of plants**. Boulder: Westview press, 1989. p.129-146.
- HARDRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Mol. Ecol.** v.1, p.55-63, 1992.
- HEUN, M.; MURPHY, J.P.; PHILIPS, T.D. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions **Theoretical and applied genetics** v.87, p.689-696, 1994.

HUENNEKE, L.F. Ecological implications of genetics variation in plant population. In: FALK, D.A & HOLSINGER, K.E., eds., **Genetics and Conservation of rare plants**. Center for plant conservation. Oxford University Press. 1991. 31-44.

HUFF, D.R.; PEAKALL, R.; SMOUTH, P.E. RAPD variation within and among natural populations of outcroosing buffalo grass (*Buchloe dactiloides* Nutt.) **Theoretical and applied genetics**. v.86, p.927-934, 1993.

HU, J.; QUIROS, C.F. Identification of brocolli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Reproduction**, v.10, p.505-511, 1991.

HURTREZ-BOUSSÈS, S. Genetic Differentiation among natural populations of the rare corsican endemic *Brassica insularis* Moris: Implications for conservation guidelines. **Biological Conservation**, v. 76, p.25-30, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, 1992. 92p.

ISABEL, N.; BEAULIEU, J.; BOUSQUET, J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified DNA loci in black spruce **Proceeding of National Academic of Science USA**, v.92, p.6369-6373, 1995.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação "in situ" de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, v.35, p.7-37, 1987.

- LACERDA, C.M.B. Diversidade genética por isoenzimas em populações de aroeira (*Miracrodum urundeuva* Freire, F. & M.F.) Anacardiacea no semiárido. Piracicaba, 1997. 81p. Dissertação de Mestrado – ESALQ/USP
- LANNNER-HERRERA, C.; GUSTAFSSON, M.; FALT, A.S.; BRYNGELSSON, T. Diversity in natural populations of wild *Brassica oleracea* as estimated by isozyme and RAPD analysis. **Genet. Res. Crop. Evol.**, v.43, p.13-23, 1996.
- LEÃO, J.F.M.C. Análise de uma unidade de conservação ameaçada - Estação ecológica de Ibicatu, Piracicaba-SP - como subsídio para elaboração de seu plano de manejo. Piracicaba, 1994. 178p. Dissertação de Mestrado – ESALQ/USP.
- LEPSCH-CUNHA, N. Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari spp.*(Lecitidaceae) Amazônia Central. Piracicaba, 1996. 147p. Dissertação de Mestrado - ESALQ/USP.
- LINCH, M. & MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**. v.3, p.91-99, 1994.
- LIU Z. & FURNIER G.R. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. **Theoretical and applied genetics** , v.87, p. 97-105, 1993.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1992. 368p.

- LOVEJOY, T.; BIERREGAARD, R.O.; RYLANDS, A.B.; MALCON, J.R.; QUINTELA, C.E.; HARPER, L.H.; BROWN, K.S.; POWELL, A.H.; POWELL, G.; SCHUBART, H.; HAYS, M.B. Edge and other effects of isolation on amazon forest fragments. In: SOULÉ, M.E. (ed). **Conservation Biology: the science of scarcity and diversity**. Massachusetts: Sinauer Press, 1986, p.257-285.
- LOVELL, M. D. & HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v.15, p. 65-95, 1984.
- MAAB, H.L.; KLASS, M. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isoenzyme and RAPD markers. **Theor. Appl. Genet** 91: p. 89-91, 1995.
- MALTEZ, H.M. & KAGEYAMA, P.Y. Variabilidade alozímica entre e dentro de duas populações naturais de Peroba rosa (*Aspidosperma polyneurum* Muell. Arg.-Apocinaceae) **Revista Brasileira de Genética**, v.20, nº3, p.329 (Suplemento), 1997.
- MILLER, M.P. **Tolls for population genetic analyses (TFPGA) 1.3**. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author, 1997.
- MILLER, M.P. **AMOVA-PREP**. Computer software distributed by the author. 1998
- MILLIGAN, B.G. & Mc MURRY, C.K. Dominant vs codominant genetic markers in the estimation of male mating success. **Mol. Ecol.**, v.2, p. 275-283, 1993.

MORELLATO, L.P.C. Estudo da fenologia de árvores ,arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. Campinas, 1991. 176p. Tese de Doutorado - Unicamp.

MORELLATO, L.P.; LEITÃO-FILHO, H.F.; RODRIGUES, R.R.; JOLY, C.A Padrões de dispersão e frutificação na Serra do Japi. In: MORELLATO, L.P. (Org) História Natural da Serra do Japi – ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. Campinas : Unicamp, Fapesp, p.112-140, 1992.

MORELLATO, L.P.C. As estações do ano nas florestas In: **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra.** Leitão-Filho, H.F.; Morelatto, L.P.C. (orgs). Campinas: Unicamp,1995.

MULLIS , K. & FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzimol.** 55: 335-350, 1987.

MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering tree density: a test of predictions. **Biotropica**, v.24, n1, p.99-101, 1992.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. **Proceedings National Academic Science**, v.70, p.3321-323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-90,1978.

- NEI, M. Genetic distance between populations **American Natural**, v.106, p.283-292, 1972.
- O'MALLEY, D.M. & BAWA, K.S. Mating system of a tropical rain forest tree species. **Amer. J. Bot.**, v.74, n.8, p.1143-9, 1987.
- O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb & Bonpl: Lecythidaceae) **Theor. Appl. Genet.**, v.76, p.9292-32, 1988.
- PAIVA, J.R. Variabilidade genética em populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss) Muell.Arg.) Piracicaba, 1992. Tese de Doutorado - ESALQ/USP.
- PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.Y., VENCOVSKY, R. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Silvae Genetica**, v.43, n °5/6, p.373-376, 1994.
- PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, F.J.; FEDAK, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **PCR Methods Applied** v.2, p.341-345, 1993.
- PERECIN, M.B. Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira santa, *Maytenus aquifolia* Mart. E *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss (Celastraceae). Piracicaba, 2000. 134p. Tese de Doutorado - ESALQ/USP.
- PEREIRA, H. **Pequena contribuição para um dicionário das plantas úteis do estado de São Paulo – indígenas e aclimatadas.** São Paulo: Typographia Brazil, 1929. 779p.

- PÉREZ-NASSER, N.; EGUIARTE, L.E.; PINERO, D.; Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). **Amer. J. Bot.**, v.80, p.45-52, 1993.
- RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.; WILLIAMS, J.G.K. RAPD markers – a new technology for genetic mapping and plant breeding. **Ag. Biotech. News Info.** v.3, p.645-648, 1991.
- RANZANI, G.; FREIRE, O. & KINJO, T. 1966. Carta de solos do Município de Piracicaba. Piracicaba, **Centro de Estudos de solos**, 85p.
- REIS, M.S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitero (*Euterpes edulis* Martius). Piracicaba, 1996. 203p. Tese de Doutorado – ESALQ/USP.
- REIS, A.; REIS, A.S.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P.; QUEIROZ, M.H. O cultivo do palmitero (*Euterpe edulis* Martius) no Sul do Brasil. In: 6º CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL - NOVA PRATA, 1988. **Anais**. Nova Prata, 1988. p.633-642.
- REIS, A.M.M. Distribuição da variabilidade genética em aroeira (*Myracrodouon urundeuva* F.F & F. Allemão) estimada com marcadores RAPD e sequenciamento de cpDNA. Piracicaba, 1999. 86p. Dissertação de Mestrado ESALQ/USP.
- ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas In: **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Alfenas, A. C. (eds), Viçosa: UFV, 1998. p.329-369.

- RODRIGUES, R.R. A vegetação de Piracicaba e municípios do entorno. **Circular Técnica IPEF**, nº189, 1999.
- SABINO J.; POLYDORO D. Mata de Santa genebra. In: Informativo da Fundação José Pedro de Oliveira, 2000
- SAIKI, R.K.; GELFOND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, B.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase **Science** , v.239, p.487-491, 1988.
- SAUNDERS, D.A.; HOBBS, R.J.; MARGULES, C.R.; Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, v.5, p.518-532, 1991.
- SEBBENN, A.M. Estrutura genética de populações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas. Piracicaba, 1997. 107p. Dissertação de Mestrado - ESALQ/USP.
- SEOANE, C.E. Variação Genética e os efeitos da fragmentação florestal em populações de guarantã (*Esenbeckia leiocarpa*) – Um exemplo de espécie tropical arbórea climática de distribuição agregada. Campinas, 1998. Dissertação de Mestrado - Unicamp.
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. Numeral taxonomy W. H. Freeman, São Francisco. 1973.



- SONNANTE, G.; SPINOSA, A.; MARANGI, A.; PIGNONE, D. Isozyme and RAPD analysis of the genetic diversity within and between *Vigna luteola* and *V. mariana*. **Annals of Botany**, 1997. 80:741-746.
- SZMIDT, A.E.; WANG, X.; LIU, M. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus silvestris* L. using haploid tissue analysis. **Heredity**, v.76, p.412-120, 1996.
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. **Biosys-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics**. Release 1,7 Illinois Natural History Survey, Illinois, 1989.
- TANSLEY, S.A.; BROWN, C.R. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation **Biological conservation**, v. 95, p.39-48, 2000.
- TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isoenzimas – variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1995. 175p.
- VIANA, V.M. Biologia e manejo de fragmentos de florestas naturais. VI Congresso Florestal Brasileiro. SBS/SBEF, Campos do Jordão, SP, 1990.
- WEEDEN, N.F.; WENDEL, J.F. Genetics of plants isosymes. In: Soltis, D.E.; Soltis, P.S. (eds) **Isosymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. p.46-72.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-70, 1984.

- WEIR, B.S. Genetic Data Analysis Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland Massachusetts. 1990 p- 373-405.
- WEIR, B.S. Genetic data analysis II : methods for discrete population genetic data Sunderland: Sinauer Associates , 1996. 445p.
- WILDE, J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical and applied genetics**, v.83, p.871-877,1992.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18 , p.6531-6535, 1990.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, n.2, p.114-138, 1943.
- WRIGHT, S. Evolution in mendelian population. **Genetics**, v.16, p.97-159,1931.
- WRIGHT, S. The genetic structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, n.3, p.395-420, 1965.