

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Florestas
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 159

Efeitos da Fragmentação Florestal sobre a Genética de Populações de Guarantã

Carlos Eduardo Sícoli Seoane

Embrapa Florestas
Colombo, PR
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, Km 111, CP 319
83411 000 - Colombo, PR - Brasil
Fone/Fax: (41) 3675 5600
www.cnpf.embrapa.br
sac@cnpf.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Luiz Roberto Graça

Secretaria-Executiva: Elisabete Marques Oaida

Membros: Álvaro Figueiredo dos Santos, Edilson Batista de Oliveira,
Honorino Roque Rodigheri, Ivar Wendling, Maria Augusta Doetzer Rosot,
Patrícia Póvoa de Mattos, Sandra Bos Mikich, Sérgio Ahrens

Supervisão editorial: Luiz Roberto Graça

Revisão de texto: Mauro Marcelo Berté

Normalização bibliográfica: Lidia Woronkoff

Foto da capa: www.fazendacitra.com.br

Editoração eletrônica: Mauro Marcelo Berté

1^a edição

1^a impressão (2007): sob demanda

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Florestas

Seoane, Carlos Eduardo Sícoli.

Efeitos da fragmentação florestal sobre a genética de populações de
guarantã [recurso eletrônico] / Carlos Eduardo Sícoli Seoane. - Dados
eletrônicos. - Colombo : Embrapa Florestas, 2007.

1 CD-ROM. - (Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1679-2599 ;
159)

1. ***Esenbeckia leiocarpa*** – Conservação.
 2. Conservação da natureza.
 3. Floresta tropical.
 4. Fragmentação florestal.
- I. Título. II. Série.

CDD 634.973 (21. ed.)

© Embrapa 2007

Autor

Carlos Eduardo Sícoli Seoane
Biólogo, Doutor,
Pesquisador da *Embrapa Florestas*
eduardo@cnpf.embrapa.br

Apresentação

A presença da espécie humana em ecossistemas naturais traz inúmeros impactos potenciais diretos e indiretos. Associada a estes impactos antrópicos está a fragmentação do ambiente natural, que leva as espécies a terem sua sobrevivência comprometida, com uma redução no total de indivíduos, o declínio nos tamanhos populacionais médios e a separação de fragmentos florestais por áreas não florestadas, o que afeta os processos genéticos fundamentais ocorrentes nas populações, como o fluxo gênico constante e o sistema de reprodução.

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito dos impactos antrópicos sobre o sistema de reprodução de *Esenbeckia leiocarpa* Engler, o guarantã, e assim oferecer fundamentos para a elaboração de estratégias de conservação para a espécie, para a gama de animais associados a ela e para a floresta tropical como um todo.

Sérgio Gaiad
Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Florestas

Sumário

1. Introdução	9
2. Objetivos	13
3. Justificativa	14
4. Revisão Bibliográfica	14
5. Materiais e Métodos	32
6. Hipóteses	44
7. Resultados e Discussão	45
8. Considerações Finais	60
9. Referências	61

Efeitos da Fragmentação Florestal sobre a Genética de Populações de Guarantã

Carlos Eduardo Sícoli Seoane

1. INTRODUÇÃO

A proteção e o desenvolvimento de um ecossistema completo, natural e auto-sustentável deve ser o principal objetivo na tomada de medidas conservacionistas, ao invés da introdução de um grande número de medidas protetoras para espécies individuais (HERMAN et al., 1990; GUNATILLEKE et al., 1985). Assim, as pressões antrópicas expansionistas e exploratórias sobre as florestas naturais induzem à necessidade de estudos sistemáticos dos ecossistemas florestais que ainda restam, a fim de escolher corretamente as estratégias de manejo e conservação a serem implantadas (KAGEYAMA, 1987).

As florestas tropicais eram consideradas como um recurso auto-renovável até a década de 1970. O trabalho de Gomez-Pompa et al. (1972) tornou evidente a não auto-renovabilidade das florestas tropicais. Atualmente, sabe-se que o processo de desmatamento nos trópicos devido às atividades antrópicas tem levado à extinção de inúmeras espécies (MYERS, 1991), com muitas das florestas tropicais que, no passado ocupavam grandes extensões contínuas, atualmente encontram-se na forma de pequenos e esparsos fragmentos. No Brasil, os desmatamentos florestais cresceram exponencialmente nas décadas de 1970 e 1980 (FEARNSIDE, 1987). As florestas tropicais vêm sendo destruídas, em grande parte, para servir as

necessidades dos países desenvolvidos (SHIMIZU, 1984), sendo então contraditórias as tentativas governamentais de aliviar a fome mundial, enquanto uma enorme quantidade de biodiversidade e outros recursos naturais estão sendo destruídos (McCORMACK, 1984) .

Uma questão básica para a conservação das florestas tropicais é: “Que tamanho e forma deve ter uma reserva para ser eficiente na preservação de espécies?” MacArthur e Wilson (1963, 1967) formularam um modelo simples para explicar o número de espécies encontradas em um local, através da biogeografia de ilhas, em que o número de espécies é o resultado de um equilíbrio entre as taxas de imigração e extinção. Tal modelo se encaixa razoavelmente bem nos dados de números de espécies, tanto em ilhas verdadeiras quanto em ilhas “virtuais”, como os fragmentos florestais, e prediz que ilhas maiores terão mais espécies que ilhas menores; isto foi usado por conservacionistas para exigir a criação de grandes reservas. O modelo de MacArthur e Wilson prediz que pequenos remanescentes florestais suportarão populações menores e menos espécies que remanescentes maiores. Os trabalhos de Bierregaard e Lovejoy (1988, 1989) e de Rylands e Kevroghliar (1988) confirmam tal predição do modelo.

COSTA (1992) afirma que, quando uma área de floresta é isolada, a importância das espécies arbóreas é ainda mais relevante, pois a continuidade da integridade estrutural e biológica da comunidade depende, em grande parte, das suas características vitais: organismos fixos, autotróficos e de grande longevidade (RANKIN DE MERONA, 1990), que conferem às espécies arbóreas um papel preponderante no ecossistema, já que a presença das espécies arbóreas formando o dossel e, consequentemente, os microclimas do sub-bosque proporcionam inúmeros nichos ecológicos, relações mutualísticas e simbióticas à floresta tropical. Por outro lado, por essas mesmas características, é difícil de ser avaliado a curto e médio prazos o impacto do isolamento nas espécies arbóreas dos fragmentos.

Mesmo quando não existe uma população reprodutiva de uma espécie arbórea capaz de mantê-la presente na comunidade, o fato não é imediatamente evidente, devido à presença de indivíduos adultos daquela espécie, assim, uma espécie pode estar efetivamente extinta anos antes da morte do último indivíduo (COSTA, 1992). Os fragmentos florestais de uma região podem dar a impressão inicial de que ainda existe uma amostra da comunidade original que irá se perpetuar, o que não é verdade, pois as mudanças na composição em espécies serão muito grandes.

Baseando-se principalmente nos dados disponíveis para *Hevea brasiliensis* (seringueira), uma espécie com densidade de indivíduos por hectare muito baixa (muito rara) da Amazônia, Kageyama e Gandara (1993) discutem sobre o tamanho mínimo de área para conservação dos recursos genéticos arbóreos tropicais. Para tais árvores, o tamanho de uma população toma uma área de 25 mil hectares, já que se tem considerado um número mínimo de 500 indivíduos não endogâmicos para representar uma população para a conservação (VENCOVSKY, 1992; KAGEYAMA, 1987). Para uma área de 100 hectares de floresta onde ocorre a seringueira, tem-se em média uma área total de 400 hectares de floresta, ou seja, para cada unidade de área onde ocorre a espécie, existem três unidades sem a espécie.

Se estes dados forem extrapolados para outras espécies, a área de uma população (25 mil ha) deve ser multiplicada por 4, para se ter a área potencial daquela população, o que dará um total de 100 mil hectares para uma população de uma espécie muito rara; como as populações de uma espécie são nômades, mudando suas posições ao longo do tempo, às vezes se ampliando ou se retraiendo, às vezes até se extinguindo, um número mínimo de populações deve ser considerado, para que haja a probabilidade de que a espécie não desapareça do local. Considerando-se que um mínimo de cinco populações é suficiente para formar uma metapopulação e, assim, viabilizar a espécie, a área total para conter a espécie muito rara passa para 500 mil hectares (KAGEYAMA e GANDARA, 1993). Tal área garantiria a perpetuação da biodiversidade arbórea local, se considerarmos uma área com forma arredondada, garantindo um mínimo de efeito de borda.

Poucas são as áreas de Floresta Atlântica *latu sensu* que alcançam um tamanho perto de 500 mil hectares e uma forma arredondada; dado que a maior parte da biodiversidade arbórea é composta por espécies raras, o efeito da fragmentação florestal em termos de extinção de espécies arbóreas do domínio da Floresta Atlântica é enorme, a longo prazo. Assim, é evidente a existência de problemas de congruência entre os limites biológicos e legais de Áreas de Conservação da Floresta Atlântica, considerando como limites biológicos de uma área para conservação os limites hipotéticos que seriam necessários para manter os processos ecológicos e genéticos de um dado conjunto de espécies.

NEWMARK (1985) conclui que é urgente, enquanto possível, um esforço no sentido de aumentar a congruência entre as fronteiras legais e biológicas das Áreas de Conservação, através do manejo cooperativo das áreas adjacentes, privadas ou não, para amenizar a perda potencial de vida silvestre. Para alcançar tal manejo cooperativo, na região do Planalto Paulista, devido ao atual estado de fragmentação florestal, necessita-se da recuperação de áreas degradadas em grande escala, além de estudos detalhados sobre os fragmentos florestais ainda existentes.

MORAN *et al.* (1987) destacam que há a necessidade da definição de padrões de variação genética em plantas para a simplificação das estratégias de conservação genética; para se chegar à modelagem pretendida e necessária da estrutura genética das espécies arbóreas da floresta tropical, os padrões de distribuição espacial (raras, intermediárias e comuns) devem ter espécies-modelo com variação e estrutura genética bem conhecidas, assim como os padrões de sucessão ecológica (pioneiras, oportunistas e climáticas), fator este ligado diretamente à dinâmica de clareiras (DENSLOW, 1980, 1995).

O presente estudo com guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engler) vem preencher uma lacuna nos estudos sobre a conservação das espécies arbóreas nativas do Brasil, servindo como modelo para se entender a variabilidade genética das espécies comuns e climáticas de distribuição agregada da floresta tropical. Outra espécie que é modelo das comuns e

climálicas, com distribuição agregada na floresta tropical semidecídua, é *Euterpe edulis*. Porém, a distribuição de *E. edulis* tem variação: na Floresta Atlântica *strictu sensu* segue mais o modelo aleatório (Reis, com. pess). Além do mais, *E. edulis* tem biologia reprodutiva distinta de *E. leiocarpa*. Portanto, as duas espécies, em conjunto, representam bem dois tipos das síndromes de reprodução das espécies climálicas e são adequadas para a modelagem pretendida. Outros exemplos de espécies climálicas são *Hymanaea courbaril* (Jatobá), *Caesalpinia ferrea* (Pau-ferro) e *Copaifera langsdorffii* (Copaíba).

Buscando detectar efeitos do tamanho do fragmento florestal sobre a genética de populações da espécie, estudaram-se dois fragmentos florestais de distintos tamanhos onde a ocorrência de *E. leiocarpa* é natural.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é obter informações sobre a estrutura genética de duas ocorrências naturais de *E. leiocarpa*, visando sua conservação e manejo e também buscando contribuir para o conhecimento da estrutura e variação genética das espécies arbóreas da floresta tropical, utilizando a espécie como modelo das espécies arbóreas da fase sucessional clímax, com alta densidade de indivíduos por hectare e de distribuição agregada.

Para tanto, buscou-se:

- 1- Estudar o sistema reprodutivo da espécie;
- 2- Quantificar a variabilidade genética intra e interpopulacional;
- 3- Estudar a estruturação espacial dos genótipos dentro das populações;
- 4- Determinar possíveis efeitos da fragmentação florestal sobre a estrutura genética e reprodução; e

5- Determinar possíveis diretrizes de manejo e conservação da espécie e da floresta tropical.

3. JUSTIFICATIVA

Para conservar as florestas para as futuras gerações, é necessário conhecer melhor as espécies nativas e os efeitos do impacto antrópico sobre essas. Entre as linhas de pesquisa necessárias, destaca-se o estudo da diversidade genética das espécies arbóreas tropicais nativas, espécies estas que têm grande importância para a manutenção da biodiversidade e da estruturação da floresta tropical como um todo. Tendo em vista a impossibilidade de estudar os fatores genéticos envolvidos na conservação para todas as espécies, utilizam-se espécies-modelo do ecossistema para representar espécies com história de vida semelhante.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

E. leiocarpa ou garantã, da família das rutáceas, é espécie climácica comum de distribuição espacial agregada e caracteriza-se morfologicamente por apresentar uma altura média de 20 m a 30 m, DAP de 40 cm a 60 cm, folhas simples, glabras, coriáceas, brilhantes, de 10 cm a 20 cm de comprimento por 5 cm a 8 cm de largura, com flores hermafroditas, actinomorfas, branco-esverdeadas, pequenas (3 mm a 5 mm de diâmetro), rasas e de odor levemente perceptível (CRESTANA *et al.*, 1982). É árvore semidecídua, esciófita, característica de floresta latifoliada primária. Não tolera, quando jovem, a insolação direta, razão pela qual não é encontrada em formações secundárias. Apresenta dispersão restrita e descontínua, ocorrendo em freqüência elevada somente em poucas áreas. Floresce a partir de final de setembro, prolongando-se até janeiro. A maturação do fruto ocorre durante os meses de julho a agosto. Produz anualmente moderada quantidade de sementes viáveis (LORENZI, 1992).

Crestana et al. (1982) apresentam dados sobre a biologia floral, ecologia de polinização e sistema reprodutivo de *E. leiocarpa*. O conjunto de

características florais se ajusta à síndrome de miofilia descrito por Faegri; Pijl (1971); com a não formação do fruto pelas flores isoladas, os autores detectaram a existência de auto-incompatibilidade, havendo então fecundação cruzada obrigatória, o que deve levar a espécie a ser alogâmica. Como seus polinizadores são de vôo curto, deve haver um certo grau de endogamia devido ao cruzamento de indivíduos aparentados.

Bawa (1973) foi pioneiro ao detectar o alto grau de alogamia que ocorre entre as espécies arbóreas tropicais; em alguns casos, porém, a endogamia naturalmente assume uma importância maior no sistema de cruzamento, como é possível no caso de *E. leiocarpa*.

A morfologia de frutos e sementes fornece indicações dos meios de dispersão: o fruto explosivo de *E. leiocarpa* se encaixa na síndrome de autocoria descrita por Howe; Smallwood (1982). Estudos preliminares do Laboratório de Biologia Reprodutiva e Genética de Espécies Arbóreas – ESALQ(USP) — conduzidos com os frutos de *E. leiocarpa*, mostraram que o mecanismo de dispersão consegue lançar o fruto até cinco metros de distância da planta mãe.

A autocoria é um dos processos menos eficientes de dispersão, e de todas as de espécies arbóreas tropicais estudadas por Loveless e Hamrick (1986), aquelas espécies com mecanismo de dispersão explosiva tiveram a maior diversidade genética entre populações (G_{st}), enquanto que foi encontrada pouca relação entre a variabilidade genética dentro das populações (H_s) e dispersão de sementes. As sementes de *E. leiocarpa*, através do seu arilo, fornecem uma recompensa potencial para possíveis dispersores, podendo ocorrer diplocoria.

Esenbeckia leiocarpa, apesar de planta da floresta clímax, é apropriada para o adensamento da matas degradadas de áreas de preservação permanente. A madeira de *E. leiocarpa* é muito forte, sendo o significado de garantã, em tupi-guarani, “madeira forte” (TIBIRIÇÁ, 1989); assim sua madeira é usada em obras externas e no chão, como postes, dormentes, moirões, estivas, esteios, vigas de pontes e na construção civil, como vigas,

caibros, ripas, batentes de portas e janelas, tábuas e tacos para assoalhos, cabos de ferramentas, entre outros (LORENZI, 1992). A alta densidade local natural das populações da espécie indica uma provável tolerância a consórcios altamente adensados com a espécie, o que é muito conveniente para plantios para exploração madeireira, porém tal prática é dificultada pelo lento crescimento dos indivíduos da espécie. Também encontraram-se, nas folhas de *E. leiocarpa*, alcalóides com propriedades contra as larvas de *Pectinophora gossypiella*, uma praga do algodão (*Gossipium spp.*) (NAKATSU *et al.*, 1990).

4.2 Diversidade genética

Um grande desafio dos programas de conservação é manter os níveis de variação genética das espécies nativas (BARRET; KOHN, 1991). Muitas espécies arbóreas possuem meios efetivos de dispersão de genes e, com isso, mantêm altos níveis de variação genética dentro de populações, com pouca diferenciação genética entre populações (HAMRICK *et al.* 1979; HAMRICK, 1983; LOVELESS; HAMRICK, 1984; HAMRICK; GODT., 1989).

Atualmente, a proteção da diversidade genética dentro das espécies em geral é uma prioridade inerente aos planos da conservação, sendo o objetivo de longo prazo manter a viabilidade evolucionária das espécies. A base para o potencial evolucionário das espécies concentra-se na variação genética, de modo que as características genéticas vão influenciar as performances fisiológicas e demográficas das populações (FOSTER, 1991).

A floresta tropical úmida, segundo Kageyama (1987), é sem dúvida o ecossistema de maior diversidade de espécies e complexidade de relações ecológicas, sendo um modelo de difícil entendimento para a conservação de seus recursos genéticos "*in situ*". Além do mais, nestes ecossistemas faltam muitos estudos de diversidade genética, sendo este o maior desafio existente aos conservacionistas de recursos genéticos. Até hoje, a estrutura genética em uma região geográfica ampla das espécies arbóreas dos neotrópicos é praticamente desconhecida (CHASE *et al.*, 1995).

Segundo Allard (1971), a determinação da forma preferencial de acasalamento (autógamas ou alógamas) nas plantas é importante para a correta determinação dos métodos de melhoramento e conservação a serem aplicados à espécie estudada, já que estas estratégias diferem nos sistemas reprodutivos.

O entendimento da estrutura genética das espécies de ocorrência nas matas remanescentes é fundamental para o estabelecimento de critérios adequados no uso destas populações para a recomposição dos ecossistemas florestais, objetivando a manutenção de sua biodiversidade, sendo, desta forma, necessário entender não só a diversidade de suas espécies, como também a variação genética entre e dentro de populações

A diversidade genética ou a variação devida a diferenças nos alelos pode ocorrer a diferentes níveis: a) de espécie dentro de ecossistemas, b) de populações dentro de espécies; e c) de indivíduos dentro de populações de espécies; sendo básica para o planejamento das estratégias de conservação genética a caracterização destes níveis de diversidade (KAGEYAMA, 1987).

O estudo da variação genética em populações naturais envolve duas questões básicas: a primeira é descrever os níveis de variação genética mantida dentro das populações de espécies, e a segunda, de particular importância para a conservação genética, é como a variação genética é partida entre e dentro de populações. Hamrick (1983), em estudo de várias populações naturais de espécies arbóreas tropicais, utilizando-se de eletroforese de isoenzimas, concluiu que a variação entre e dentro de populações é afetada diretamente pelo sistema de cruzamento entre as espécies e o mecanismo de dispersão das sementes, além do tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica da espécie, o modo de reprodução primário, o sistema de cruzamento e o tipo de comunidade em que a espécie comumente ocorre.

A organização dos níveis de variação genética entre e dentro de populações é referenciada como estrutura genética e é decorrente de fatores tais

como: sistema reprodutivo, níveis de endogamia, seleção natural, fluxo gênico e deriva genética entre e dentro de populações. Tais fatores podem explicar o comportamento de alelos nas populações (REIS, 1996).

Hamrick *et al* (1993) consideraram que espécies com baixa densidade de indivíduos adultos teriam maior heterogeneidade genética espacial devido à dispersão de sementes, se comparadas com as espécies de alta densidade, ou seja, este fato é menos freqüente em espécies com dispersão de sementes restrita onde as plântulas têm probabilidade maior de serem recrutadas nas proximidades de suas matrizes.

Gandara (1996) destaca a importância do conhecimento da estrutura genética espacial para o estabelecimento de estratégias de amostragem de populações naturais, tanto para a conservação genética quanto para fins de melhoramento, possibilitando a formação de amostras significativas.

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

Hill *et al.* (1978), em estudo da variação genética de espécies leguminosas ao longo do Rio Solimões, na Amazônia, observaram que os índices de heterozigosidade e de similaridade genética, os padrões demográficos e a biologia indicam estreita correlação entre variabilidade genética e a estratégia adaptativa. As populações com alta probabilidade de extinção são mais homozigotas que as com maior probabilidade de sobrevivência, isto é, populações que sofrem perturbações são mais homozigotas.

Loveless e Hamrick (1987), estudando a estrutura genética de espécies arbóreas tropicais por isoenzimas, encontraram no geral uma alta diversidade genética total ($HT = 0,352$), baixa diversidade relativa entre as populações ($Gst = 0,05$), e que o fluxo gênico entre as populações ocorre pelo vento para algumas espécies e por animais para outras. Observaram, ainda, dois padrões de distribuição: o espacial, que é a distribuição dos alelos dos genótipos em uma população; e o temporal, que é o fluxo gênico, determinado pela forma de dispersão e polinização.

Hamrick e Godt (1990) com base na literatura de 653 estudos de aloenzimas, observaram os dados genéticos de 449 taxas, que envolviam plantas herbáceas, arbóreas e arbustivas, visando relacionar os níveis de diversidade com a ecologia das espécies. Em média, as plantas apresentaram 50 % dos locos polimórficos, uma heterozigosidade média esperada de 0,149 e o número de alelos por loco variou de 1,5 a 3,0. Verificaram que, para as espécies arbóreas tropicais, a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro de populações e que os dados revelam variações expressivas nos níveis de diversidade genética, e a porcentagem de locos polimórficos e o número de alelos/loco. Concluíram ainda que o sistema reprodutivo e a distribuição geográfica foram os fatores que mais contribuíram para a variação dos dados.

4.3 Eletroforese de Isoenzimas

Uma técnica rápida, prática e adequada para o estudo de populações naturais consiste no método bioquímico de isoenzimas. Este método permite a obtenção de informações sobre a estrutura genética das populações em um período de estudo relativamente curto, não exige área experimental, possibilita ensaios com várias populações e apresenta um custo equivalente aos métodos quantitativos, além das enzimas serem a expressão direta dos genes, aumentando desta forma a precisão das estimativas dos parâmetros genéticos (MORAES, 1993).

Internacionalmente, vários pesquisadores têm-se utilizado das técnicas de eletroforese de isoenzimas em estudos, visando à conservação e manejo

das florestas naturais (HAMRICK *et al.* 1979; HAMRICK 1983, 1987; HAMRICK; LOVELESS 1986, 1989; HAMRICK; MURAWSKI 1991; LOVELESS; HAMRICK 1987; BUCKLEY *et al.* 1988; HALL *et al.* 1996; PAIVA 1992; MORAES 1993; REIS 1996; GANDARA 1996; SEBBENN 1997; MALTEZ 1997; SOUZA 1997; As espécies brasileiras estudadas são de baixa densidade local (raras) e secundárias na sucessão natural, excetuando *Euterpe edulis* que é comum localmente, da fase sucessional clímax e apresentam distribuição agregada na Floresta Mesófila Semidecídua.

A possibilidade de contar o número de locos com variação, verificar número de alelos, distinguir homozigotos de heterozigotos, tornou-se efetiva com a codificação dos locos de proteínas, especialmente as enzimas. A técnica mais comum para distinguir diferentes formas genéticas (isoenzimas) de uma enzima é a eletroforese em gel (FUTUYMA, 1992).

A variação genética pode ser expressa através de alterações das atividades enzimáticas. As proteínas, quer sejam enzimas ou não, são altamente informativas do ponto de vista genético, para estudos da caracterização, sistemática e evolução, por serem a expressão do produto dos genes (MARCON, 1986).

O princípio básico geral da eletroforese consiste na colocação de extratos de diversos indivíduos num gel poroso e na migração dos íons (proteínas e aminoácidos) em solução nestes extratos, ao serem submetidos à ação de um campo elétrico, migrando no sentido do eletrodo de sinal contrário ao seu. A diferenciação na composição de aminoácidos e nas cargas elétricas confere às enzimas diferentes taxas de movimentação, de modo que tendem a se separar no gel. Suas posições são encontradas através de sistemas específicos de coloração, permitindo a formação de certos padrões (zimogramas) passíveis de interpretação (ALFENAS, 1991; FUTUYMA, 1992). Para o estudo de locos enzimáticos, pressupõe-se a representatividade dos mesmos do genoma como um todo e a neutralidade, ou seja, estes locos não estão sujeitos diretamente às forças seletivas. Reis (1996) apresenta uma discussão mais detalhada sobre o assunto.

As técnicas bioquímicas de eletroforese têm sido utilizadas por muitos autores como base para a estimativa da variação genética em populações de plantas e animais. Estas estimativas são quantificadas em termos de número de locos polimórficos por população, o número efetivo de alelos por locos, ou o número médio de locos heterozigotos por indivíduo (HAMRICK, 1983). A análise eletroforética dos padrões de proteínas e isoenzimas é um método simples, rápido, sensível, de alto valor informativo e potencial ao melhoramento de essências florestais (ALFENAS, 1986).

O uso da eletroforese de isoenzimas para descrever a distribuição da variação genética apresenta algumas vantagens, como: I) herança genética dos traços detectados eletroforeticamente pode ser facilmente demonstrada; II) a maioria dos locos de aloenzimas são codominantes e a freqüência alélica pode ser calculada sem a necessidade de cruzamentos genéticos, e III) a estimativa da variação genética pode ser comparada diretamente entre populações ou espécies (HAMRICK *et al* 1979).

Corder e Lopes (1993), estudando árvores adultas e progêniens de *Eucalyptus spp.*, concluíram que as análises genéticas pelos métodos eletroforéticos podem ser realizadas em qualquer fase de sua existência, desde que se conserve os indivíduos vivos em condições de campo e viveiro, tornando possível analisar com maior precisão o controle genético dos locos envolvidos. Isso é possível já que se tem genótipos maternos (árvores adultas) e suas progêniens, facilitando a compreensão dos estudos de genética de populações, do sistema reprodutivo, do fluxo gênico, sendo também uma valiosa ajuda no monitoramento genético de populações melhoradas.

Alfenas et al (1991) descrevem o método de eletroforese de isoenzimas com detalhes, para essências florestais. Moraes (1993), por sua vez, faz um levantamento dos sistemas enzimáticos mais utilizados em coníferas e angiospermas, citando para as últimas a MDH, AAT, LAP, PER, PGI, PGM, SKDH, ACP, G6PD, IDH e EST.

4.4 Fragmentação Florestal

A fragmentação florestal é uma das maiores ameaças para a conservação da biodiversidade dos remanescentes das florestas tropicais (SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 2006). A velocidade dos desmatamentos ocorrentes na floresta tropical é sem precedentes na sua história evolutiva e, assim, tem efeitos profundos no ecossistema (BIERREGAARD et al., 1992). Contudo, os efeitos biológicos e físicos da fragmentação florestal são pouco conhecidos. Algumas mudanças são facilmente predizíveis, pelo menos qualitativamente. A floresta tropical tem um papel protetor fundamental no balanço do ecossistema global, regional e local e para a conservação dos recursos hídricos e biota; no entanto, com a sua retirada, as condições microclimáticas sofrem mudanças, principalmente nas bordas, e os padrões macroclimáticos locais poderão ser alterados (KPOS, 1989), assim como a composição de espécies (JANZEN, 1990); os tamanhos das populações serão reduzidos, o que terá consequências genéticas deletérias (BIERREGAARD et al., 1992).

Terborgh (1990) comparou a densidade de animais que são presas de grandes felinos na floresta de Barro Colorado Island (BCI), Panamá, onde os grandes predadores foram extintos, com a de Cocha Cashu, Peru, onde há populações preservadas destes, e encontrou valores 10 à 20 vezes maiores para BCI. Terborgh (1992) lembra que, como os grandes predadores necessitam de grandes espaços para encontrar suas presas em número suficiente, eles desaparecerão em florestas fragmentadas a partir de um tamanho mínimo, e isso terá um efeito desestabilizador em populações de consumidores primários, entre eles os predadores e eventuais dispersores de sementes, o que por sua vez deverá afetar a composição de árvores da floresta. Smart et al. (1985) detectaram mudanças na vegetação devido à ausência de pisoteio e herbivoria de grandes mamíferos em Uganda.

Howe (1984) estudou as implicações da dispersão de sementes por animais, para o manejo da floresta tropical, e constatou que muitas árvores tropicais têm frutos adaptados para o consumo animal, e muitos animais

tropicais dependem deles para se alimentar por, pelo menos, parte do ano; alguns destes sistemas de dispersão mutualistas são pivotais para a comunidade, pois algumas destas árvores frutificam no período de escassez e, assim, mantêm espécies de pássaros e mamíferos frugívoros que são vetores para a dispersão e recrutamento de muitas espécies em outras épocas do ano. A conservação destas espécies-chave para o funcionamento da floresta como um todo é uma linha de pesquisa que tem crescido nos últimos anos (FRANKIE et al., 1990; GILBERT, 1984), já que a sua ausência em determinado fragmento florestal pode acarretar em muito mais que sua própria extinção.

No Brasil, um trabalho de relevância que contempla o estudo dos efeitos da fragmentação florestal é o Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF), que desde 1981 observa as alterações sucedidas na flora e na fauna de alguns fragmentos de Floresta Amazônica de terra firme de diversos tamanhos, em comparação com a floresta contínua. Tal projeto envolve diversas pesquisas no campo da biologia, tais como: a inter-relação entre animais, as alterações microclimáticas, a demografia de plantas, a dinâmica de populações de animais e a relação com a biodiversidade (KAPOS, 1989; CIÊNCIA HOJE, 1991). Das espécies arbóreas aí ocorrentes, apenas *Couratari spp.* (LEPSH-CUNHA, 1996) foram estudadas do ponto de vista da genética de populações.

Na Região Sudeste brasileira, um ecossistema que representa de maneira crítica este modelo de paisagem fragmentada é a Floresta Mesófila Semidecídua, também conhecida como Floresta do Planalto. Ocupa trechos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás e é abrigo de uma rica diversidade de espécies, distinta em sua estrutura e composição das Florestas Amazônica e Atlântica *strictu sensu* (LEITÃO-FILHO, 1987), sendo assim um bom alvo para estudos visando à conservação.

Fatores tais como o histórico de perturbação de fragmentos, seu tamanho e sua forma, seu nível de isolamento, seu tipo de vizinhança e o tipo do ecossistema são apontados como aspectos que influenciam a estrutura da

comunidade de plantas (VIANA, 1995). VIANA et al. (1992), estudando fragmentos florestais do interior do Estado de São Paulo, concluiram que: 1) Grande parte dos fragmentos são pequenos e isolados; 2) A ocorrência de cipós em alta densidade dificulta a regeneração natural das espécies arbóreas; 3) A freqüência de árvores mortas é alta; 4) O efeito de borda é significativo e complexo e 5) Os fragmentos necessitam de manejo para evitar o prosseguimento do processo atual de degradação e perda de biodiversidade. Quanto ao manejo mais adequado a ser utilizado, continua sendo ainda uma questão em aberto. Viana (1995) enfatiza a necessidade de se considerar os fragmentos florestais pequenos, isolados e não sustentáveis como remanescentes de uma rica e ameaçada biodiversidade e, portanto, merecedores de uma abordagem séria, priorizando o manejo e conservação destas unidades.

4.5 Conseqüências genéticas da fragmentação florestal

A maior parte dos estudos de conservação de fragmentos citados anteriormente baseia-se principalmente em conhecimentos ecológicos e demográficos, não contendo o enfoque genético, essencial para que a elaboração de estratégias de manejo sejam bem sucedidas, já que um dos processos mais importantes a ser considerado para a conservação das florestas tropicais ainda passa quase desapercebido ao homem comum: as conseqüências deletérias na diversidade genética das espécies, causadas pela fragmentação ambiental. A principal conseqüência deste processo no tocante à genética é que as espécies têm sua sobrevivência comprometida devido às alterações nos padrões de troca de genes (BALLAL et al., 1994; YOUNG et al., 2000). São raros os casos de espécies estudadas do ponto de vista genético, sendo estes indispensáveis à exploração racional, à recuperação e, principalmente, à conservação da floresta tropical.

Algumas das ferramentas básicas para estes estudos consistem no conhecimento do sistema reprodutivo, de acasalamento, do fluxo gênico intra e interpopulacional, de distribuição espacial dos indivíduos e, principalmente, da distribuição da variação genética entre e dentro de populações das espécies que compõem as comunidades em estudo (KAGEYAMA, 1987).

A diversidade e a estrutura genética podem ser alteradas se a fragmentação florestal modificar os padrões de dispersão do pólen e sementes (FORÉ et al., 1992). A fragmentação de habitats também pode colaborar para modificações no sistema de acasalamento, alterando a composição dos agentes polinizadores ou mesmo em seus comportamentos individuais. Sendo assim, estas mudanças também podem se refletir nos parâmetros relativos ao sistema de acasalamento (SOUZA, 1997).

Mosaicos de habitats, incluindo manchas de ecossistemas nativos, fragmentos antropogênicos e áreas agrícolas e urbanas apresentam probabilidades desprezíveis de dispersão e estabelecimento de adultos e juvenis de parte da fauna (SANTOS, 1995), fauna esta responsável por grande parte do fluxo gênico das plantas, ao atuarem como polinizadores e dispersores de semente. Grant (1980) afirma que a entrada constante e alta de genes em uma população através do fluxo gênico é o fator mais importante na manutenção da coesão genética entre as populações de uma espécie.

Ellstrand; Ellan (1993) reforçam que o fluxo gênico é considerado benéfico por prevenir a depressão endogâmica e a depleção da variação genética em pequenas populações. Para a maioria das espécies perenes, o aumento do fluxo gênico em apenas duas décadas é suficiente para anular o efeito da deriva e da endogamia. A transferência de poucos genomas de sucesso de uma geração para outra pode ser suficiente para manter o fluxo gênico na magnitude de ordem histórica e natural.

O atual estado fragmentado das florestas de São Paulo afeta o fluxo gênico de muitas espécies nativas e as põem em risco de extinção. As espécies ocorrentes nos fragmentos do Planalto Paulista teoricamente estão sofrendo o efeito de erosão genética, devido à redução de suas populações, ou seja, algumas destas espécies perderão parte de sua variabilidade genética natural, principalmente na forma de alelos raros que não estão representados nos genes dos indivíduos remanescentes nos fragmentos. As espécies arbóreas de distribuição espacial rara provavelmente são as mais afetadas pela fragmentação florestal, podendo mesmo estar ausentes nos fragmentos isolados onde a ocorrência da espécie é natural.

Tal fenômeno vem ocorrendo em escala mundial para os mais diferentes taxa: Boitani (1984) - mamíferos da Europa; Newman; Novakova (1985), Van-der-Zande et al. (1984), Banse; Bezzel (1984) e Dmowski; Kozakiewicz (1990) - aves da Europa; Da Silva (1988) - *Grisea grisea*, ave da Amazônia; RAFE et al. (1985), Blake (1984) - aves da América do Norte; Johnsigh et al.(1990)- elefantes e tigres da Índia; Abrams (1985) - aves da África do Sul; Menges et al.(1986), TABACCHI et al.(1990), Decamps (1987) e Herman et al.(1990) - espécies animais da mata ciliar; Saunders (1990), Mansergh; SCOTTS (1989) e Lawrence (1990) - mamíferos da Austrália; Heinen; Merriam (1990), Merriam; Lanoue (1990), Lorenz; Barrett (1990), Price; Longland (1989), BLEICH; Wehausen (1990); Thomas; Irby (1990) e Foster; Rahs (1985) - mamíferos da América do Norte; Conry (1989) - búfalo *Bos gaurus* da Malásia; Brennan (1985) - macacos (*Cercopithecus neglectus*) do Quênia; Szacki (1987) - mamíferos da Europa; Saunders (1990) - Cracatua (*Calyptorhynchus funereus*) da Austrália; Menge (1990) - *Pedicularis furbishiae*, uma planta perene da América do Norte; De-Viedma et al. (1985) e Wood; Samways (1991) – lepi dópteros da Europa ; Hall et al. (1996) - *Pithecellobium elegans*, árvore tropical rara da Costa Rica.

Na literatura, as predições iniciais sobre as consequências genéticas da fragmentação de habitats enfocavam o tamanho populacional reduzido e o isolamento populacional (SOUZA, 1997). A importância do tamanho populacional relacionada à estrutura de cruzamento, dinâmica genética e evolucionária foi primeiramente reconhecida por Wright (1931, 1938 e 1946). Os estudos mais recentes discutem sobretudo aspectos da variação genética, níveis de endogamia, fluxo gênico e divergência interpopulacional (YOUNG et al., 1996; 2000; SEOANE et al., 2005). Em síntese, a fragmentação florestal pode causar a perda da variação genética por duas vias. Primeiro, a redução do tamanho populacional cria gargalos genéticos (“bottlenecks”) porque os indivíduos que ficam contêm apenas uma pequena amostra do “pool” gênico original. Em segundo lugar, como consequência, a pequena população remanescente, caso permaneça isolada por muitas gerações, terá contínua perda de alelos devido à deriva genética aleatória (SOUZA, 1997).

Teoricamente, as alterações decorrentes da fragmentação florestal contribuem para a erosão da variação genética e aumento da divergência genética entre populações, através dos seguintes eventos: a) aumento da deriva genética, b) aumento da endogamia, c) redução do fluxo gênico e d) aumento da probabilidade de extinção local. Tais efeitos apresentam implicações em relação à persistência da espécie. A curto prazo, a perda de heterozigosidade pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional. A longo prazo, a redução da riqueza alélica deve limitar a habilidade das espécies a responderem às mudanças devida à ação de forças seletivas (YOUNG et al., 1996; ELLSTRAND; ELLAN, 1993; CHARLESWORTH; CHARLESWORTH, 1987).

Dados provenientes de estudos com marcadores moleculares sugerem que a redução do tamanho populacional e isolamento das populações causam redução da variabilidade genética (BILLINGTON, 1991; POLLANS; ALLARD, 1989; SAUNDERS et al., 1990; WILCOVE, 1987). Os dados destes trabalhos sugerem que a perda genética verificada deve-se mais ao efeito de gargalo do que pela deriva genética (YOUNG et al., 1996).

Outra consequência é a ocorrência de endogamia ou cruzamento entre indivíduos aparentados. A perda de vigor decorrente da endogamia é conhecida como depressão endogâmica. Este fenômeno é mais estudado em animais, e ainda pouco se conhece sobre seu efeito em plantas, porém sabe-se que a endogamia reduz a performance reprodutiva das espécies (TEMPLETON, 1990). A endogamia acarreta em uma diminuição dos níveis de variação genética, resultando numa baixa taxa de recrutamento e potencial risco de extinção (HAMRICK; LOVELESS, 1984). Quase sem exceção, a endogamia forçada, que pode ocorrer pela falta de indivíduos da mesma espécie ou pela falta do agente polinizador, ou ainda pelo cruzamento de indivíduos muito aparentados, resulta em deterioração geral do vigor e o aparecimento de outros efeitos adversos (ALLARD, 1971).

A endogamia é o cruzamento entre indivíduos aparentados e tem como consequência genética a homozigose dentro de populações. Em plantas, a endogamia ocorre por autofecundação e cruzamento entre indivíduos

aparentados. A autofecundação é o extremo da endogamia e é evitada em plantas por mecanismos de auto-incompatibilidade ou por dioicia.

Endogamia biparental é mais freqüente quando as populações são pequenas ou quando exibem estrutura genética espacial. Esta estrutura é desenvolvida quando a dispersão de pólen e sementes é restrita (ELLSTRAND; ELLAN, 1993).

A redução drástica do número de indivíduos de uma espécie em um certo local num determinado tempo é designada de gargalo (“Bottlenecks”). O gargalo contribui para a perda de alelos, especialmente os raros, e isto é muito mais efetivo do que a perda de heterozigosidade (BARRET; KOHN, 1991). Hamrick; Murawski (1991) afirmam que populações que estão pequenas por algumas gerações, ou que foram submetidas ao “efeito de gargalo”, recentemente, devem ter uma menor variabilidade genética que populações que estão grandes e estáveis por algumas gerações. Contudo, o mesmo fator que gerou o efeito de gargalo pode acarretar em forças seletivas que contrabalanceiem a perda de variabilidade genética gerada pelo efeito de gargalo, como, por exemplo, uma seleção favorecendo indivíduos heterozigotos (COATES, 1992).

Barret; Kohn (1991), com base no trabalho de Nei (1975), salientam que a quantidade da redução da heterozigosidade média por loco não depende apenas do tamanho do gargalo, mas também da taxa de cruzamento e crescimento da população. Caso esta cresça rapidamente, a redução da heterozigosidade é mínima, mesmo que o número de fundadores seja pequeno. Em contraste, a perda do número médio de alelos por loco é profundamente afetada pelo tamanho do gargalo. Em geral, a perda de alelos excede muito a perda da heterozigosidade média, embora com o tempo a perda de variação se tornará significativa.

Por sua vez, a deriva genética muda a distribuição da variação genética de duas formas: diminui a variação dentro de populações, refletida pela perda de heterozigosidade e de alelos, e aumenta a diferenciação entre populações. A diminuição da heterozigosidade pode estar refletida diretamente na redução de genes e nos remanescentes pequenos, ou pela

erosão da heterozigosidade quando a endogamia acompanha a fragmentação (BARRET; KOHN, 1991; ELLSTRAND; ELLAN, 1993; BALLAL et al., 1994)

Dada uma estrutura estável e assumindo um modelo de fluxo gênico de ilhas, a divergência genética interpopulacional aumentará devido à deriva, particularmente quando o fluxo gênico for menor que 1. Em contraste, apenas uma pequena quantidade de fluxo gênico (equivalente a um indivíduo por geração) é requerida para reduzir a perda de alelos (TEMPLETON, 1990; YOUNG et al., 1996).

Onde as populações são pequenas e isoladas umas das outras, a deriva genética terá uma influência dominante na estrutura genética. Estas populações estão sujeitas à perda de variação e tornam-se potencialmente susceptíveis à extinção. Quando as populações tornam-se pequenas por um longo período de tempo, os efeitos da amostra são acumulativos. As mudanças nas freqüências gênicas são aleatórias devido às amostras de gametas de uma geração para a outra. Em grandes populações, tem-se pouco efeito de deriva. Em populações pequenas, com menos de 100 indivíduos, as freqüências gênicas podem sofrer grandes flutuações em diferentes gerações, liderando para a perda de alelos (BARRET; KOHN, 1991). O efeito da deriva pode ser amenizado quando o fluxo gênico entre ilhas permanece, mesmo que os níveis do fluxo gênico sejam baixos (TEMPLETON, 1990; ELLSTRAND; ELLAN, 1993; YOUNG et al., 1993).

As previsões teóricas indicam que as consequências da deriva dependem do número de gerações que se passaram nos remanescentes; as espécies com gerações que se procedem em curto espaço de tempo (tais quais as herbáceas) mostram grande perda de variação oriunda da deriva. Quando se tem poucas gerações, os resultados observados se devem ao efeito de gargalo genético (YOUNG et al., 1996).

Há na literatura uma grande quantidade de estudos sobre os efeitos do isolamento reprodutivo de espécies arbóreas causado pela fragmentação florestal; por exemplo, Hall et al (1996), Sousa et al. (1997), Tabarelli e

Gascon (2005), e Seoane et al. (2000 a, b; 2005 a, b; 2006). O trabalho pioneiro de HALL et al. (1996), desenvolvido na Costa Rica, mostrou que a variação genética foi menor em populações da espécie arbórea rara, *Pithecellobium elegans*, de menor tamanho e mais longe da floresta contínua, sendo que 10 % da variação genética total observada para a espécie deve-se à diferenciação entre amostras coletadas em fragmentos pequenos e na floresta contínua, e concluem que a fragmentação do que foi uma vez uma vasta área de floresta com *Pithecellobium elegans* está se convertendo em populações pequenas, ilhadas e geneticamente erodidas.

Souza (1997) estudou os efeitos da fragmentação florestal na variabilidade genética de *Chorisia speciosa*, através de locos alozínicos, ao comparar os parâmetros genéticos de quatro populações naturais, sendo uma representando um fragmento relativamente grande e não perturbado (com área de 287,28 hectares) e três representando fragmentos florestais pequenos e perturbados (com área de 10, 25 e 50 hectares), todos na região de Bauru, SP. A espécie apresentou altos valores relativos aos índices de diversidade em todos os fragmentos, não havendo perda significativa de heterozigosidade da população fonte para as populações fragmentadas. Conforme as previsões teóricas, a deriva genética ficou evidenciada pela perda, fixação e oscilação aleatória de alelos e também pela alta divergência interpopulacional ($F_{ST} = 0,183$). Nos fragmentos pequenos e perturbados, foram detectados três fenômenos, tanto para alelos raros quanto para comuns, característicos da deriva genética: perda e fixação de alelos e oscilações aleatórias das freqüências alélicas.

Os gargalos artificiais criados na população do maior fragmento mostraram que a perda genética se refletiu nas distribuições alélicas, através das perdas e oscilações de freqüências de alelos raros e não se refletiu nas heterozigosidades, o que foi esperado, já que não houve a existência de estruturação espacial nas populações estudadas da espécie. O autor concluiu que: 1) a maior consequência genética da fragmentação florestal foi a perda da variação genética que, neste estudo, refletiu nas mudanças das distribuições alélicas e não foi evidenciada nos índices de diversidade; 2) em poucas gerações (50 anos de fragmentação), evidenciou-se perda

genética e 3) para ampliar a compreensão dos fenômenos de perda genética que ocorrem nos fragmentos pequenos e perturbados, seria importante trabalhar com senso demográfico ao invés de amostragem e proceder amostras separadas de indivíduos jovens (banco de plântulas da floresta ou através da coleta de sementes e obtenção de progênies) e adultos, já que os jovens, por serem representativos natos de eventos reprodutivos pós-fragmentação, refletiram melhor as perdas genéticas (SOUZA, 1997).

Seoane et al. (2005 a, b, 2006) estudaram *Euterpe edulis* Martius, o palmitero jussara, uma palmeira da Mata Atlântica que pode ser considerada como uma espécie-chave, produzindo anualmente uma grande quantidade de frutos consumidos avidamente pela fauna. Entre os resultados, destaca-se que o fluxo gênico via dispersão de sementes foi três vezes menor na População Degradada em comparação à População Conservada (Seoane et al., 2005 b, 2006). No entanto, tal diminuição de fluxo gênico provavelmente não é suficiente para haver efeitos da deriva genética aleatória nas populações de *E. edulis*, pois, segundo a regra *One Migrant Per Generation* (OMPG), ou “Um Migrante Por Geração” (WANG, 2004), o nível de fluxo gênico para manter a diversidade genética e evitar a depressão endogâmica em populações fragmentadas é de no mínimo um indivíduo migrante por população local por geração, o que é atendido tanto na População Conservada quanto na População Impactada (SEOANE et al., 2005 b). No entanto, a fragmentação florestal parece trazer uma diminuição do banco de plântulas de *E. edulis*, o que demonstra que a conexão genética (SEOANE et al., 2006) e o fluxo gênico atendendo à regra OMPG não implica necessariamente em números suficientes para a manutenção do remanescente e para colonização de novas áreas. Assim, é provável que os remanescentes populacionais dos fragmentos pequenos sejam inviáveis demograficamente, pois uma diminuição do banco de sementes e plântulas, somada à exploração clandestina de adultos, acarretará em uma diminuição maior ainda dos bancos e, em médio a longo prazo, na extinção local da espécie. Esta diminuição local de *E. edulis* deve estar acarretando em efeitos em cascata sobre uma grande gama de espécies da fauna e flora, entre estes os frugívoros associados à *E. edulis* e

as espécies vegetais das quais estes são naturalmente os dispersores de sementes. Tal efeito em cascata é sugerido pelo menor fluxo gênico ocorrendo entre os fragmentos florestais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Locais de estudo

O trabalho foi realizado em quatro áreas de ocorrência natural de *E. leiocarpa*: duas subpopulações na Estação Ecológica de Caetetús e duas subpopulações na Estação Ecológica de Ibicatú, ambas do Instituto Florestal do Estado de São Paulo.

A Estação Ecológica de Caetetús, de 2.178,84 hectares, localiza-se entre a Latitude 22°22' e 22°27' S e Longitude de 49°40' a 49°43' W, entre os municípios de Gália e Alvinlândia, no Estado de São Paulo, com altitude variando entre 500 a 600 m. O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwa (quente com inverno seco). A temperatura máxima anual é de 30 °C, mínima de 10 °C e média de 20 °C. A precipitação pluviométrica média anual é 1.480 mm e está concentrada nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, sendo maio e junho os meses mais secos do ano (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 1987).

A Estação Ecológica de Ibicatú, de 76,4 hectares, localiza-se entre a Latitude 22°47' a 22°48' S e Longitude de 47°49' a 47°50'W, no Município de Piracicaba, SP, com altitude média de 500 m. O clima, segundo Catharino (1989), citado em Costa (1992), pelo Sistema de Thornwaite, é do tipo úmido, com uma pequena concentração da evapotranspiração potencial no verão. A precipitação pluviométrica média anual situa-se acima de 1.000 mm.

5.2 Materiais

O material analisado consistiu de:

1. Oitenta indivíduos adultos de *E. leiocarpa*, sendo vinte de cada uma das quatro subpopulações amostradas (Subpopulações C1 e C2 da E.E. de Caetetús e subpopulações I1 e I2 da E.E. de Ibicatú)
2. Progênies constituídas de vinte plântulas oriundas de frutos de vinte árvores matrizes, sendo dez das árvores matrizes da subpopulação C2 da E.E. de Caetetús e dez da subpopulação I1 da E.E. de Ibicatú.

Uma vez que um dos objetivos deste estudo foi a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, a amostragem dos indivíduos foi totalmente aleatória dentro das ocorrências. Portanto, não foi estabelecido um critério de distância mínima entre indivíduos.

Cada um dos frutos coletados em campo foi colocado individualmente em saco de papel devidamente identificado por progénie. Os frutos foram expostos ao sol, para secagem, em caixas de madeira, durante quarenta dias, no pátio do Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, sendo cada lote de semente posteriormente colocado no viveiro do mesmo departamento, separadamente em caixas de plástico com terra adubada. Quarenta e cinco dias depois, quando as plântulas atingiram 5 cm a 7 cm de altura, procedeu-se a sua repicagem para laminado plástico de uma média de 30 plântulas por progénie. As mudas foram mantidas cobertas com telas plásticas Sombrite 50 %.

Coletaram-se folhas de todas as plantas adultas marcadas no campo. Estas folhas foram embaladas em sacos plásticos, identificados com o número da árvore de origem, acondicionadas em caixas de isopor, contendo gelo, e transportadas para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), do Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP, em Piracicaba, e então armazenadas em geladeira a 50 °C.

5.3 Amostras para Eletroforese de Isoenzimas

A eletroforese de isoenzimas para a caracterização genética da espécie foi realizada no LARGEA, segundo a metodologia proposta por Kephart (1990)

e Alfenas et al. (1991). Para esta caracterização, utilizaram-se tecidos foliares de plântulas de progênies e de indivíduos adultos. A coleta dos tecidos foliares das plântulas foi feita preferencialmente no período da manhã, os quais foram imediatamente submetidos à maceração, evitando assim a perda da atividade enzimática do material. Posteriormente, as amostras foram embaladas em ependorfes e armazenadas em congelador a -5 °C. O tecido foliar dos indivíduos adultos era macerado e imediatamente submetido a eletroforese.

5.4 Extração das Enzimas

A rotina de extração das enzimas empregou aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, macerado com auxílio de um bastão de vidro, em placas de porcelana, sobre barras de gelo, com adição de aproximadamente 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polyvinyl Pirrolidone (PVP 40), 7 mg de Polyvinyl Pirrolidone (PVP-360) e 200 microlitros de solução de extração número 1 de Alfenas et al. (1991, p. 41), modificada pela ausência de 2-Mercaptoetanol. Esta solução de extração é a mais comumente usada nos protocolos desenvolvidos no LARGEA. A solução extraída individualmente para cada planta (adultos e progênies), contendo o material genético (enzimas), era absorvida em pedaços de papel de filtro (Whatman nº 3), nas dimensões de 6 mm x 10 mm (“Wicks”) e posteriormente submetidas ao processo de eletroforese.

Cada gel acondicionava amostras de 20 indivíduos, sendo nas duas extremidades adicionados “wicks” embebidos em solução de azul de bromofenol a 0,1 %, objetivando marcar a distância máxima possível de migração das alozimas durante a “corrida”.

5.5 Procedimentos de Eletroforese

A eletroforese de isoenzimas foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30), 13 %. As “corridas” foram realizadas em geladeira com temperatura de 5 °C. Sobre os géis, foram adicionadas placas de vidro e cubas de gelo, visando reduzir o aquecimento,

causado pelo atrito, no processo de migração das enzimas. Nos primeiros 30 minutos de “corrida”, manteve-se a corrente elétrica constante a 35 mA, sendo após elevada a 40 mA, até o final do processo. A voltagem nos eletrodos foi de 120 a 180 volts e no gel de 6 a 8 volts nos primeiros trinta minutos e 140 a 210 volts e 8 a 10 volts, nos eletrodos e no gel, respectivamente, no restante do tempo de “corrida”.

Os “wicks” contendo as amostras foram retirados dos géis, após 30 minutos de migração, sendo o tempo médio do processo de “corrida” de aproximadamente sete horas. Neste ponto, o marcador de azul de bromofenol atingiu de 8 cm a 9 cm de migração. Terminadas as corridas, os géis foram cortados em seis fatias, de espessura em torno de 1,0 mm, conforme Alfenas et al. (1991, pag. 116), sendo a primeira fatia descartada. Quatro das faces restantes foram submetidas à coloração em enzimas específicas. Os sistemas enzimáticos PGI, PRX e EST foram coloridos sempre nas fatias mais nobres (as duas primeiras).

5.6 Procedimento de Coloração dos Géis

Para obtenção dos sistemas enzimáticos SKDH, PGM, 6PGDH, PGI, IDH e MDH, diluiu-se todos os reagentes (substratos, cofatores, catalisadores e outros) no tampão de coloração específico do sistema enzimático e, em seguida, essa solução foi adicionada ao gel, acondicionado em cuba de porcelana e imediatamente incubado no escuro, por 20 a 40 minutos, em estufa a 37 °C, até o aparecimento das bandas.

Alfa-esterase (a-EST) foi preparada em duas soluções: solução A e B. A solução A foi obtida pela diluição do substrato acetona 50 %, sendo após adicionados 40 ml de tampão de coloração. Após, esta solução, foi despejada sobre o gel e este incubado no escuro, em estufa a 37 °C. A solução B foi obtida pela diluição do Fast Garnet GBC Salt em n-propanol adicionados 40 ml do tampão de coloração. Após 20 minutos, adicionou-se a solução B ao gel imerso na solução A e as bandas apareciam em um intervalo de um a dois minutos.

Para a obtenção da peroxidase (PRX), diluiu-se o substrato no tampão de coloração, adicionando-se estes ao gel e depois pipetando-se 2 ml de água oxigenada 3 %. As bandas apareciam em um intervalo de um a dois minutos.

No anexo, está listado o protocolo para a revelação dos sistemas isoenzimáticos de *E. leiocarpa*.

Posteriormente à revelação, os géis foram secados e fotografados. Os géis foram interpretados logo após a revelação das isoenzimas, o que sem dúvida é a melhor forma de obtenção dos resultados, visto que a interpretação direta dos zimogramas fica, assim, menos sujeita a erros.

A distância do marcador de bromofenol foi medida no momento em que os géis foram cortados, a fim de obter-se, como colocam Alfenas et al (1991), os valores de Rf. A estimativa da migração relativa (RM) foi realizada conforme Cheliak; Pittel (1984).

A distinção dos locos aparentes foi a mesma definida por Reis (1996): em que 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. Ainda, o autor afirma que a coerência entre genitor feminino (receptor de pólen) e progênie proporciona a devida consistência a essa forma de interpretação.

Para a numeração dos locos e alelos neste estudo, os sistemas enzimáticos com revelação de mais de um loco, denominaram-se alfa-numericamente de forma crescente, dos locos mais catódicos para os mais anódicos, usando-se o mesmo procedimento para os alelos dentro dos locos, portanto, identificados pela sua migração relativa (Rf).

5.7 Análise Estatística

A interpretação dos zimogramas permitiu a obtenção dos genótipos de cada indivíduo estudado, tanto adultos quanto integrantes das progênies,

possibilitando estimar os vários parâmetros caracterizadores da variabilidade genética entre e dentro das populações de *E. leiocarpa*.

5.7.1 Variabilidade Genética Intrapopulacional

Utilizando o programa BIOSYS-1 de Swofford; Selander (1989), a variação genética foi calculada a partir das estimativas das freqüências alélicas estabelecidas para cada subpopulação de adultos e para cada população de progênies. As freqüências alélicas descrevem a variação para um loco (TORGGLER, 1994) e foram obtidas pela contagem direta dos alelos por loco, dividido pelo número total de alelos no loco.

A estimativa das freqüências alélicas permitiu calcular os índices de diversidade genética para adultos e progênies: a heterozigosidade média observada (H_o), heterozigosidade esperada (\hat{H}_e) segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, a porcentagem de locos polimórficos (P), o número médio de alelos por (A) e o índice de fixação alélica de Wright (f) para quatro subpopulações de adultos (duas de Caetetús e duas de Ibicatú), e também para as duas populações de progênies. Essas estimativas também foram obtidas a partir do programa BIOSYS-1, desenvolvido por Swofford; Selander (1989).

A heterozigosidade média esperada para cada loco() foi obtida a partir das freqüências alélicas, segundo expectativas de equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com Nei (1987). A diversidade gênica ou heterozigosidade esperada (), conforme Nei (1973), refere-se ao nível de heterozigosidade de uma população obtido a partir de freqüências alélicas desta. Este valor equivale à quantidade de heterozigotos esperada (heterozigosidade) em uma população de cruzamentos ao acaso (panmítica). Esta medida pode representar a variação tanto em populações de espécies alógamas quanto autógamas. É considerada uma medida mais apropriada de diversidade gênica.

A heterozigosidade observada pode ser calculada diretamente da amostra a partir das freqüências genotípicas, podendo ser estimada para um ou mais locos (BROWN; WEIR, 1983). Para obter-se a heterozigosidade média

observada (H_o), somaram-se os valores obtidos para cada loco e dividiu-se pelo número total de locos (monomórficos mais polimórficos).

A porcentagem de locos polimórficos (P) avalia o grau de polimorfismo encontrado na amostra (FUTUYMA, 1992) e foi obtida pela média aritmética do número total de alelos pelo número de locos. Considerou-se como um loco polimórfico, o loco em que a freqüência do alelo mais comum não ultrapassasse 99 %. Assim, a proporção mínima de heterozigotos que o loco poderá apresentar para ser considerado polimórfico é 2 %.

O número médio de alelos por loco (A) é uma estatística que enfatiza a riqueza alélica, representando uma quantidade definida e espera-se ser grande quando a amplitude do polimorfismo for grande. Possui, por outro lado, uma forte dependência do tamanho amostral (NEI, 1987). O número médio de alelos por loco a 99 % de probabilidade (A) foi obtido pela média aritmética do número total de alelos dividido pelo número de total de locos.

Wright (1951) considera o coeficiente de endogamia como uma medida do grau de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações, possibilitando a verificação da ocorrência de excessos de homozigotos ou perda de heterozigotos na população e podendo indicar o possível sistema de cruzamento da espécie. Este índice permite acessar os níveis de fixações alélicas por loco e a nível de média de locos, informando sobre o grau de endogamia dentro das populações. O também pode ser usado para testar desvios das freqüências genotípicas unilocos, das expectativas de Hardy-Weinberg (MURAWSKI; BAWA, 1994), devido aos acasalamentos em tal situação ocorrerem de forma aleatória. Portanto, em populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não existe endogamia, e o valor de é igual a zero. O índice de fixação de Wright () foi estimado ao nível de locos e média entre locos, segundo Vencovsky (1994) e Sebbenn (1997).

Foi realizado o teste de qui-quadrado para verificar se o valor de era estatisticamente diferente de zero, em nível de loco, conforme Li; Horvitz (1953) e Sebbenn (1997). Para a média entre os locos, usou-se o teste z, a um intervalo de confiança de 95 % ou 99 % de probabilidade (LOISELLE et al., 1995), respectivamente.

5.7.2 Análise da Estrutura Genética

A estrutura genética das populações e a das subpopulações foram abordadas por metodologias distintas, porém complementares do ponto de vista biológico (REIS, 1996): estatística F de Wright (WRIGHT 1951, 1965) e análise da variância de freqüências alélicas (COCKERHAN, 1969; WEIR, 1990; VENCOVSKY, 1992).

A estatística F de Wright fornece, além da proporção da diversidade contida entre as subpopulações (F_{ST}), os níveis de fixação alélica para a espécie e para a média das subpopulações (F_{IS}). É interessante empregar esta metodologia para facilitar a comparação com os vários trabalhos sobre a estrutura genética de populações naturais que a utilizam-na.

Por sua vez, a análise de variância fornece a distribuição da variabilidade genética nos vários níveis hierárquicos em que está estruturada a amostragem nas populações.

5.7.2.1 Estatística F de Wright

A caracterização da estrutura genética entre populações foi realizada a partir das estatísticas F de Wright (WRIGHT 1951, 1965), também empregando-se o programa BIOSYS-1 (SWOFFORD; SELANDER, 1989), conforme Nei (1977), considerando duas populações de progênies, uma de Caetetus e outra de Ibicatu.

\hat{F}_{IS} corresponde ao índice de fixação alélica médio dentro das populações ou, em outras palavras, a probabilidade de dois indivíduos tomados ao acaso de uma população serem idênticos por descendência.. \hat{F}_{IT} é o índice de fixação alélica total das populações como um todo, ou seja, a probabilidade que dois indivíduos tomados ao acaso no conjunto das populações serem idênticos por descendência. Valores positivos de \hat{F}_{IS} e \hat{F}_{IT} indicam déficit de heterozigotos e valores negativos indicam o oposto.

\hat{F}_{ST} é o índice de divergência genética entre populações. Este índice é uma estimativa de variância entre freqüências alélicas de populações

diferentes e mede a probabilidade que dois indivíduos tomados ao acaso em duas populações distintas sejam idênticos por descendência. \hat{F}_{ST} é muitas vezes usado como medida de diferenciação entre subpopulações.

Para verificar se \hat{F}_{IS} e \hat{F}_{IT} eram significativamente diferentes de zero, no loco, usou-se o teste de qui-quadrado, proposto por Li; Horvit (1953), também utilizado para \hat{F}_{ST} . Já para verificar a significância de F_{ST} , utilizou-se o teste X^2 proposto por Workman; Niswander (1970). Para testar se as médias de \hat{F}_{IS} e \hat{F}_{IT} eram diferentes de zero, usou-se o teste z, de acordo com Loiselle et al. (1995).

Para testar-se a significância da média de \hat{F}_{ST} , utilizou-se o teste de c^2 de contingência entre o número de cada alelo observado, em cada população (contagem direta), contra o número esperado de cada alelo para cada população (estimada pela multiplicação da freqüência de cada alelo por loco pelo número total de gametas de cada loco).

5.7.2.2 Análise da Variância de Freqüências Alélicas

Os indivíduos adultos foram analisados pela análise de variância de freqüências alélicas segundo Cockerham (1969), Weir (1990) e Vencovsky (1992). Para cada alelo de cada loco polimórfico dos adultos, foi feita uma análise da variância no modelo hierárquico desbalanceado. Esta estimativa foi realizada para os adultos, devido à amostragem estar estruturada de forma hierárquica, isto é, genes dentro de indivíduos, dentro de subpopulações, dentro de populações.

Esta estatística também fornece os índices de fixação de Wright (F e f), bem como a divergência genética entre populações e subpopulações (coeficientes de coancestralidades). As estimativas médias dos valores de \hat{F} , \hat{f} e $\hat{\theta}_P$ foram obtidas pela soma dos quadrados médios individuais, divididos pela soma dos graus de liberdade. As análises das variâncias foram obtidas a partir do procedimento VARCOMP do programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1985).

5.7.3 Sistema Reprodutivo

O sistema reprodutivo foi inicialmente caracterizado pela verificação da existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg nas subpopulações e população de adultos e progênies; posteriormente, estimou-se a taxa de cruzamento aparente, unilocos e multilocos. Ainda, compararam-se as freqüências alélicas do óvulo e do pólen, e a homogeneidade do pólen nos acasalamentos.

5.7.3.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Endogamia de Wright

A aderência das subpopulações e população ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada a partir do programa BIOSYS-1 de Swofford; Selander (1989). O teste utilizado foi o qui-quadrado (c^2) não agrupado. Porém, quando os valores das freqüências genotípicas esperadas apresentavam-se menores do que 1, estes eram agrupados em classes como: homozigotos para os alelos mais comuns, heterozigotos comuns/raros e homozigotos raros e outros heterozigotos, e testados pelo c^2 agrupado e exato de Fischer. Conforme Gomes (1985), nos casos em que temos valores esperados abaixo de 1, e muitos abaixo de 5, esta metodologia é a mais apropriada, permitindo, assim, a confiabilidade do teste.

Quando os locos não se encontraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, estes foram submetidos ao teste de equilíbrio de endogamia de Wright. O teste de c^2 para verificar a aderência dos genótipos observados aos genótipos esperados segundo o equilíbrio de endogamia de Wright, foi estimado conforme Vencovsky (1994). Este teste considera o índice de fixação de Wright para as estimativas das freqüências genotípicas esperadas de indivíduos homozigotos e heterozigotos. As freqüências genotípicas esperadas foram obtidas segundo Weir (1990). Os graus de liberdade foram dados por: $GL = [(n^o \text{ de genótipos} - 1) - (n^o \text{ de alelos} - 1) - 1]$, sendo um grau de liberdade perdido devido ao \hat{f} (VENCOVSKY, 1994). Ainda, como pode ser observado, devido a computação dos graus de liberdade, este teste só pode ser aplicado em locos que possuam no mínimo três alelos.

5.7.3.2. Taxa de Cruzamento

As estimativas das taxas de cruzamento foram obtidas a partir do modelo proposto por Ritland; Jain (1981), empregando-se o programa MLTR (RITLAND, 1996), baseado no modelo de acasalamento misto de Clegg (1980) e Ritland; Jain (1981), estimando-se assim a taxa de cruzamento multilocos, unilocos, a taxa de cruzamento entre parentados e o índice de fixação entre indivíduos maternos. Estas estimativas foram feitas para as progêneres de ambas populações.

O programa permite estimar \hat{t}_s e \hat{t}_m para a população e para as famílias, através do método Newton-Raphson, e as freqüências alélicas do óvulo e do pólen pelo método de máxima verossimilhança. Para estimar o erro padrão das estimativas de cruzamento unilocos e multilocos para a população, o programa utilizou o método *bootstrap*, onde a unidade de amostragem são as plantas dentro das famílias. Utilizaram-se mil reamostragens dentro das famílias, baseado em Murawsky et al. (1994).

Segundo Shaw; Allard (1982), a diferença entre a taxa multilocos e unilocos ($\hat{t}_s - \hat{t}_m$) decorre da existência de acasalamentos entre indivíduos parentados na população.

5.7.3.3 Diferenças nas Freqüências Alélicas Entre Pólen e Óvulo

Para verificar se os genótipos maternos estavam cruzando na mesma taxa na população, dado que um dos pressupostos básicos do modelo de Ritland; Jain é a homogeneidade nas freqüências alélicas do pólen e do óvulo, compararam-se as freqüências alélicas entre pólen e óvulo, através da estimativa de \hat{F}_{ST} de Wright para cada loco. As estimativas de \hat{F}_{ST} para locos com três alelos, foram obtidas a partir de Vencovsky (1993).

O \hat{F}_{ST} também foi usado para estimar se o conjunto de pólen é homogêneo na população. Este teste foi realizado considerando-se as famílias como subpopulações e submetendo-as ao programa BIOSYS-1 de Swofford;

Selander (1989). Desta forma, obteve-se a diferença nas freqüências alélicas polínicas contribuintes para a formação das progênies.

Para testar a significância de \hat{F}_{ST} para cada loco, aplicou-se o c^2 (Workman; Niswander, 1970).

5.7.4 Distribuição Espacial dos Genótipos

Com o intuito de analisar a estrutura genética espacial da população, procedeu-se a análise espacial dos genótipos através da autocorrelação, baseada em Sokal; Oden (1978a, b) e Heywood (1978). O programa utilizado foi o “Autocorr”, elaborado por Jonh S. Heywood.

A autocorrelação foi feita para os locos polimórficos detectados nos indivíduos adultos, visando detectar a existência de estruturação familiar e verificar se os genótipos apresentavam distribuição aleatória ou estruturada. Neste último caso, as árvores que estão próximas podem ser mais semelhantes ou aparentadas ou completamente diferentes (SOKAL; ODEN, 1978). A análise de autocorrelação considera cada alelo (p_i) como uma variável. Assim, cada genótipo homozigoto recebe o valor de $p_i = 1,0$, o heterozigoto $p_i = 0,5$, e quando o alelo está ausente $p_i = 0,0$. O número de alelos analisados por loco corresponde a $n - 1$, onde: n é o número de alelos. Portanto, em um locos com dois alelos, apenas um foi avaliado, já que o outro tem freqüência dependente deste.

A caracterização da estrutura espacial foi feita a partir do índice I de Moran, de acordo com SOKAL; ODEN (1978). Foram utilizados intervalos de 3 metros de distância. Assim, quando o desvio padrão exceder 1,96 e 2,58, I será significante a um nível de 95 % e 99 % de probabilidade, respectivamente.

O índice I de Moran pode assumir valor entre -1 e +1, sendo que -1 significa que os indivíduos pareados são completamente diferentes (autocorrelação negativa). O valor +1 significa que os indivíduos pareados são idênticos (autocorrelação positiva) (GANDARA, 1996). Valor zero

significa ausência de autocorrelação, isto é, os indivíduos estão aleatoriamente distribuídos no espaço.

O método de comparações dentro de classes de distâncias preestabelecidas para a análise da distribuição espacial dos genótipos da *E. leiocarpa* compara todos os pares de indivíduos que apresentem uma distância entre si dentro de um intervalo pré-estabelecido, recebem peso 1, e as demais comparações recebem valor zero (GANDARA, 1996). O número de classes de distâncias variou entre as subpopulações, objetivando um número de pares em torno de 30 em cada classe de distância. Para facilitar o entendimento do comportamento da distribuição espacial dos genótipos por classes de distância, construiu-se gráficos (correlogramas).

5.7.5 Estimativa do Fluxo Gênico (\hat{N}_m)

O fluxo gênico foi obtido a partir da metodologia proposta por Wright (1951), entre a quantidade de migrantes (\hat{N}_m) e a divergência genética entre populações (\hat{F}_{ST}).

De acordo com Cockerham; Weir (1993), o emprego do $\hat{\theta}_2$ como estimador da divergência genética entre populações é mais adequado do que o \hat{F}_{ST} .

6. HIPÓTESES

A - Estrutura genética: as sementes de *E. leiocarpa* são dispersas por autocoria. Contudo, através do seu arilo, fornecem uma recompensa em potencial para possíveis dispersores, podendo ocorrer diplocoria. Uma eventual semente dispersada para longe irá formar um novo indivíduo longe da matriz. Ao atingir a maturidade, este indivíduo entra no ciclo reprodutivo e forma sementes. Como a dispersão da semente normalmente ocorre por autocoria, as sementes são, em sua maioria, dispersas a curtas distâncias da matriz. Depois de alguns ciclos reprodutivos, ali surge uma nova

subpopulação (reboleira), com variabilidade genética influenciada pelo efeito fundador.

Portanto, a população se encontra estruturada geneticamente em subpopulações, devido ao efeito fundador, havendo bastante variabilidade genética entre as subpopulações (Osp elevado).

B - Variabilidade genética intrapopulacional e fluxo gênico: a endogamia decorrente da estrutura genética é naturalmente atenuada pela polinização miofílica e pela eventual semente oriunda de outra subpopulação, favorecendo a troca gênica dentro e entre as subpopulações. Assim ocorre fluxo gênico dentro das populações. Contudo, devido à grande distância entre populações (fragmentos florestais), é pequeno o fluxo gênico entre as elas.

C - Distribuição espacial dos genótipos: na subpopulação, os genótipos se distribuem aleatoriamente, devido principalmente à troca gênica entre diversos indivíduos da subpopulação através da polinização miofílica.

D - Efeitos da fragmentação: sendo as outras hipóteses comprovadas, a variabilidade genética da população é mantida, em sua maior parte, pelas diferenças genéticas entre e dentro de subpopulações. Fragmentos pequenos, com poucas subpopulações, devem sofrer problemas genéticos, decorrentes do baixo número de subpopulações formando a população.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Variabilidade Genética

7.1.1 Freqüências Alélicas

Na Tabela 1 são apresentadas as freqüências alélicas das subpopulações e populações de adultos, assim como as freqüências alélicas das subpopulações de progêniens.

Tabela 1. Freqüências alélicas, tamanho da amostra (n) e número total de alelos (TA) nas populações e subpopulações de adultos e nas populações de progêneres de *E. leiocarpa*, para onze *loci* isoenzimáticos.

Loco	Alelo	Adultos						Progêneres		
		Caetetus (fragmento grande)				Ibicatú (fragmento pequeno)				
		Pop	SPop. 1	SPop. 2	Pop	Spop.1	Spop. 2			
Pgm - 1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	N	45	26	19	43	23	20	190	180	
6pgdh-2	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,992	1,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	
	N	45	26	19	43	23	20	190	200	
Idh - 1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	N	45	26	19	43	23	20	190	180	
Skdh-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998	0,998
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	
	N	45	26	19	43	23	20	190	200	
Mdh-1	1	1,000	1,000	1,000	0,977	0,950	1,000	1,000	0,993	
	2	0,000	0,000	0,000	0,023	0,050	0,000	0,000	0,007	
	N	45	26	19	43	23	20	140	140	
Mdh - 2	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	N	45	26	19	43	23	20	120	140	
Mdh-3	1	0,852	1,000	0,639	0,869	0,870	0,868	0,686	0,938	
	2	0,148	0,000	0,361	0,131	0,130	0,132	0,292	0,062	
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	
	N	44	26	18	42	23	19	118	89	
Mdh - 4	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,988	0,969	
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,022	
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,009	

continua

Tabela 1. Freqüências alélicas, tamanho da amostra (n) e número total de alelos (TA) nas populações e subpopulações de adultos e nas populações de progêniés de *E. leiocarpa*, para onze *loci* isoenzimáticos.

Loco	Alelo	Adultos						Progêniés			
		Caetetús (fragmento grande)				Ibicatú (fragmento pequeno)					
		Pop	SPop. 1	SPop. 2	Pop	Spop.1	Spop. 2				
	N	33	26	7	43	23	20	165	160		
Pgi - 2	1	0,578	0,577	0,579	0,675	0,595	0,763	0,744	0,719		
	2	0,422	0,423	0,421	0,325	0,405	0,237	0,256	0,281		
Est- 1	N	32	13	19	40	21	19	158	183		
	1	0,118	0,167	0,059	0,500	0,548	0,450	0,069	0,381		
	2	0,632	0,714	0,529	0,134	0,119	0,150	0,566	0,211		
	3	0,250	0,119	0,412	0,366	0,333	0,400	0,362	0,408		
Prx - 1	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000		
	N	38	21	17	41	21	20	145	168		
	1	0,500	0,519	0,472	0,256	0,283	0,225	0,121	0,224		
	2	0,318	0,308	0,333	0,372	0,304	0,450	0,500	0,323		
TA	3	0,170	0,154	0,194	0,360	0,413	0,300	0,379	0,450		
	4	0,011	0,019	0,000	0,012	0,000	0,025	0,000	0,003		
	N	44	26	18	43	23	20	29	181		
	TA	18	17	17	19	18	18	23	22		

Dos onze *loci* avaliados, três foram monomórficos (Pgm-1, Idh-1 e Mdh-2) e oito polimórficos (Skdh-1, 6pgdh-2, Mdh-1, Mdh-3, Mdh-4, Est-1, Prx-1 e Pgi-2). No fragmento grande (Caetetús), os adultos amostrados apresentaram 18 alelos no total, e as progênies 23; no fragmento pequeno (Ibicatú), foram detectados 19 alelos nos adultos e 22 nas progênies.

Ao comparar-se os resultados para as duas subpopulações de adultos do fragmento grande (Caetetús), nota-se que em Mdh-3, o alelo 1 está fixado na subpopulação 1, ocorrendo o alelo 2 na subpopulação 2. Em Prx-1, ocorre o alelo 4 na subpopulação 1, estando o mesmo ausente na subpopulação 2. Já em Est-1, o alelo 2 é o mais freqüente em ambas as subpopulações, sendo o alelo 3 muito mais freqüente na subpopulação 2. Estes resultados não apontaram grande diferença entre estas subpopulações.

A comparação dos resultados das duas subpopulações de adultos do fragmento pequeno (Ibicatú) mostra que, em Mdh-1, o alelo 2 ocorre na subpopulação 1 e está ausente na subpopulação 2. Em Prx-1, o alelo 4 ocorre na subpopulação 2 e está ausente na subpopulação 1. Em Prx-1, há também uma inversão de freqüência entre os alelos 2 e 3 como o mais freqüente. Estes resultados também não apontaram grande diferença entre estas subpopulações.

Comparando a população de adultos do fragmento grande com a do pequeno, nota-se que, em Mdh-1, o alelo 1 está fixado no fragmento grande, ocorrendo o alelo 2 em baixa freqüência no fragmento pequeno. Há uma inversão nas freqüências alélicas nos *loci* Est-1 e Prx-1. No fragmento grande, em Est-1 o alelo 2 é o mais freqüente, enquanto que, no fragmento pequeno, o alelo 1 é o mais freqüente. Para Prx-1, o alelo 1 é o mais freqüente no fragmento grande e o alelo 2 é o mais freqüente no fragmento pequeno. Esta comparação tampouco mostrou grandes diferenças entre as populações.

A comparação entre os resultados para adultos e para progênies no fragmento grande demonstra que há uma maior fixação de alelos nos

adultos amostrados: o alelo 1 está fixado em 6pgdh-2 e em Skdh-1. Também o alelo 1 de Mdh-4 está fixado nos adultos, ocorrendo os alelos 2 e 3 nas progênies. Há inversão de alelo mais freqüente em Prx-1, sendo o mais freqüente nos adultos o alelo 1 e nas progênies o alelo 2. Ocorrem outros alelos exclusivos nas progênies: o alelo 3 em Mdh-3 e o alelo 4 em Est-1. Contudo, os adultos apresentaram o alelo 4 em Prx-1, o qual está ausente nas progênies

Nota-se uma menor diferença na freqüência e fixação de alelos, na comparação entre os resultados para os adultos e progênies do fragmento pequeno, em relação aos do fragmento grande. Em Skdh-1, o alelo 1 está fixado nos adultos, ocorrendo o alelo 2 nas progênies. Em Mdh-4, o alelo 1 está fixado nos adultos, ocorrendo os alelos 2 e 3 nas progênies. Em Prx-1, ocorre o alelo 4 nas progênies, ausente nos adultos. Há inversão de freqüência alélica nos sistemas Est-1 e Prx-1.

Assim, a comparação entre as freqüências alélicas de adultos e progênies da população do fragmento grande demonstra maiores diferenças do que no fragmento pequeno, podendo isto estar associado ao fato de que a população de adultos do fragmento maior é constituída de mais subpopulações, o que leva a um maior potencial para a troca gênica entre as subpopulações. Por sua vez, o fragmento menor tem menos subpopulações, havendo assim uma menor entrada de genes e, portanto, uma menor troca gênica entre indivíduos diferentes, o que pode permitir ou aumentar a homogeneização da população.

Ao comparar os resultados para as progênies dos dois fragmentos, a população do fragmento grande apresenta exclusivamente o alelo 2 em 6pgdh-2, o alelo 3 em Mdh-3, o alelo 3 em Mdh-4 e o alelo 4 em Est-1. A população do fragmento pequeno apresenta exclusivamente o alelo 2 em Mdh-1 e o alelo 4 em Prx-1. Há inversão de freqüência alélica nos *locus* Est-1 e Prx-1. Estes resultados não apontaram grande diferença entre estas populações.

7.1.2. Índices de Diversidade Genética

Diversidade Genética Intrapopulacional

Os índices de diversidade intrapopulacionais, em nível de subpopulações e população são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Índices de diversidade intrapopulacionais nas populações, subpopulações de adultos e populações de progênies de *E. leiocarpa* e os correspondentes desvios padrões da média, entre parênteses.

Catetus (fragmento grande)				Ibicatú (fragmento pequeno)				
	Adultos		Progênies	Adultos		Progênies		
	Spop1	Spop2	Pop	Spop1	Spop2	Pop		
Ho	0.141	0.199 (0.84)	0.174 (0.077)	0.183 (0.076)	0.181 (0.082)	0.182 (0.079)	0.182 (0.080)	0.172 (0.079)
He	0.145	0.193 (0.082)	0.171 (0.076)	0.182 (0.075)	0.176 (0.080)	0.178 (0.077)	0.180 (0.079)	0.1702 (0.079)
A	0.138	1.55 (0.25)	1.64 (0.310)	2.00 (0.33)	1.55 (0.25)	1.73 (0.30)	1.73 (0.300)	2.00 (0.030)
P	27.27	36.36	36.36	36.36	36.36	45.45	36.36	36.36
f	0.027	-0.031	-0.018	-0.005	-0.028	-0.022	-0.011	0.000

As populações adultas e as progênies amostradas foram polimórficas em 36,36 % dos *loci* amostrados, com valores indo de 27,27 % a 45,45 %. Os *loci* segregaram de 1 a 4 alelos.

O polimorfismo dentro de locos é medido pelo número médio de alelos por locos (A) e entre locos pela porcentagem de locos polimórficos (P). O número médio de alelos por locos (A), para os adultos, foi de 1,64 na população do fragmento grande (Caetetus) e 1,73 na população do fragmento pequeno (Ibicatú). As progênies de ambas as populações apresentaram A igual a 2. Este resultado deixa claro a maior riqueza alélica na amostra de adultos de Ibicatú.

É interessante observar que, nas progênies de ambas as populações, detectou-se uma riqueza alélica maior do que nos indivíduos adultos avaliados. Este resultado ou decorre da presença de fluxo gênico, com alelos advindo de outras populações e/ou subpopulações, ou da presença destes alelos em adultos das próprias subpopulações não amostrados.

No fragmento grande (Caetetus), a subpopulação 1 de adultos apresentou um P igual a 27,27 e a subpopulação 2 de 36,36. Por sua vez, esta população, tanto para adultos quanto para progênies, apresentou um P de 36,36.

Os valores encontrados para a heterozigosidade média observada quase sempre foram maiores que os da heterozigosidade esperada, sugerindo um efeito de seleção para heterozigotos. Porém, tais valores para heterozigosidade observada e esperada são estatisticamente iguais, o que, aliado ao fato de que os índices de fixação alélica não foram significativamente diferentes de zero, levam as populações a estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os valores encontrados para a heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e esperada (He), nas duas subpopulações do fragmento grande, foram claramente diferentes entre si, com valores de 0,141 para \hat{H}_o e 0,145 para He na subpopulação 1 e 0,199 para \hat{H}_o e 0,193 para He na subpopulação 2, levando a valores iguais a 0,174 para \hat{H}_o e 0,171 para He, na média para a população. No fragmento pequeno, estes valores foram muito semelhantes entre as subpopulações. Esses valores ficaram em torno de 0,182 para Ho e 0,178 para He.

Comparando-se os resultados obtidos para as progênies do fragmento grande com a subpopulação de adultos de origem (subpopulação 2), observam-se poucas variações para Ho e He. Este resultado foi igual para o fragmento pequeno. Esta alta correlação entre as freqüências alélicas das progênies e adultos mostra que o evento reprodutivo, avaliado pelas

progênies, foi bem amostrado. Porém, a maior riqueza alélica, detectada nas progênies pelo número de alelos por locos, sugere a presença de fluxo gênico. Todos os valores de heterozigosidade (H_o e H_e) foram altos para todas as subpopulações e populações de adultos e progênies, relativamente aos estudos de Hamrick et al. (1979) e Hamrick; Godt (1990). Esta alta heterozigosidade é de valor relevante, dado ao grande número de novas recombinações genotípicas possíveis de ocorrer nas próximas gerações, capacitando a adaptação e colonização da espécie a novos ambientes, ou seja, é de grande valor para a evolução da espécie.

A porcentagem de locos polimórficos encontrada para *Esenbeckia leiocarpa* neste experimento é menor que aquelas encontradas para as outras espécies arbóreas da Mata Atlântica brasileira já estudadas através de isoenzimas. Ao se fazer uma comparação direta entre os índices de diversidade genética obtidos neste experimento com aqueles obtidos para a única outra espécie clímax da Mata Mesófila Semidecídua estudada do ponto de vista da genética de populações (REIS, 1996), *E. edulis*, nota-se que, para *E. leiocarpa*, todos estes valores foram muito menores que os de palmiteiro, o que era esperado, já que *E. edulis* tem meios mais eficientes de fluxo gênico devido às síndromes de polinização e dispersão de sementes.

Principalmente em nível intrasubpopulacional, esperava-se um coeficiente de endogamia relativamente alto, decorrente ao efeito fundador. Porém, o coeficiente de endogamia foi baixo, estando as populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O índice de fixação endogâmica (f) mostrou níveis de endogamia mínimos, com valores negativos para adultos e um pouco maiores para as progênies, o que sugere também um possível efeito de seleção da fase de plântula para adulto, favorecendo os indivíduos heterozigotos.

7.2. Análise da Estrutura Genética

Os resultados obtidos para a caracterização da estrutura genética se encontram nas tabelas 3 e 4. A estrutura genética das populações de *E.*

leiocarpa foi caracterizada para as progênies pela estatística F de Wright (1965) (Tabela 3) e para os adultos pela análise de variância de freqüências alélicas, devido à amostragem apresentar mais níveis hierárquicos (Tabela 4).

Tabela 3. Estimativas de Fis, Fit e Fst para duas populações naturais de progênies de *E. leiocarpa*, baseadas em oito locos isoenzimáticos.

Loco	Fis	Fit	Fst
6pgdh-2	-0,008	-0,004	0,004
Skdh-1	-0,003	-0,001	0,001
Mdh - 1	1,000	1,000	0,004
Mdh - 3	-0,040	0,058	0,095
Mdh - 4	0,347	0,349	0,003
Pgi - 1	0,303	0,304	0,001
Est- 1	-0,131	-0,033	0,086
Prx - 1	0,070	0,087	0,019
Média	0,049	0,094	0,048

A estrutura genética corresponde à distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. A forma como ela se distribui em populações de uma espécie é determinada por fatores ecológicos e genéticos. Os principais fatores ecológicos envolvidos são a síndrome de dispersão de pólen e semente, os quais determinam em parte a distribuição espacial e geográfica. Os fatores genéticos são determinados pelo sistema reprodutivo, como forma de acasalamento (dioicia, monoicia e hermafroditismo) e mecanismos de auto-incompatibilidade e apomixia.

As estimativas para Fis, nas progênies, revelaram excesso de heterozigotos em alguns *loci*: 6pgdh-2, Skdh-1, Mdh-3 e Prx-1. A média, porém, revelou uma endogamia reduzida. O loco Pgi-1 exibiu deficiência de heterozigotos. Os valores de Fst encontrados para adultos indicam que aproximadamente 91 % da variação genética encontra-se entre os indivíduos dentro das populações e que somente cerca de 9 % da variação encontra-se entre as

populações. Os *loci* com maiores valores para Fst foram Mdh-3 e Est-1.

Tabela 4. Estimativas dos coeficientes de coancestralidade para quatro populações naturais de *E. leiocarpa*, com dados obtidos a partir de indivíduos adultos. Øp = Distância genética entre populações; Øsp = Distância genética entre subpopulações; F = correlação entre alelos dentro de indivíduos de diferentes subpopulações; f = correlação entre alelos dentro de indivíduos, dentro de diferentes subpopulações.

	Øp	Øsp	F	F
Mdh11	-0,003	0,008	0,998	1,000
Mdh12	-0,003	0,008	0,998	1,000
Mdh31	-0,146	0,290	-0,248	-0,247
Mdh32	-0,146	0,290	-0,248	-0,247
Pgi11	0,003	-0,002	0,259	0,260
Pgi12	0,003	-0,002	0,259	0,260
Est11	0,278	0,003	-0,025	-0,045
Est12	0,404	0,011	0,066	0,159
Est13	-0,019	0,082	-0,262	-0,275
Prx11	0,116	-0,012	-0,144	-0,180
Prx12	-0,004	-0,002	-0,197	-0,195
Prx13	0,080	-0,003	-0,034	-0,040
Prx14	-0,011	-0,002	0,001	0,001
Média	0,087	0,028	-0,026	-0,031

As estimativas dos coeficientes de coancestralidade para a divergência genética entre populações de adultos (Øp) apresentaram valores negativos em 7 locos e positivos em 6, sendo a média positiva. Esta divergência média entre populações foi de 8,7 %, o que é um valor alto, em comparação aos estudos de outras espécies. O coeficiente de coancestralidade para divergência entre subpopulações (Øsp) apresentou valores negativos em 6 dos locos analisados e positivos em 7 locos. A

média de $\bar{\sigma}^2_{sp}$ foi positiva (2,8 %). As estimativas de variâncias negativas indicam que as correlações intra-classes são maiores que entre as classes. Assim, em vários dos locos, os indivíduos dentro das subpopulações (reboleiras) são mais diferentes do que entre populações.

Valores negativos das estimativas de variância também indicam desvios do modelo aleatório. A análise de variância de freqüências alélicas pressupõem que todas as variações ocorrem única e exclusivamente devido às variações aleatórias, isto é, à deriva genética, sendo ausentes outras fontes de variações como seleção e mutação.

O coeficiente de coancestralidade entre populações médio (0,087), foi muito próximo ao Fst para os adultos (0,094, calculado porém não apresentado), aumentando a confiabilidade das estimativas de divergência genética entre populações. As estimativas dos índices de fixação de Wright a partir das duas metodologias (índices F e de coancestralidade) também apresentaram resultados similares, sugerindo ausência de endogamia, portanto, equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações e subpopulações de adultos.

Esperava-se uma variabilidade genética entre populações proporcionalmente grande em relação à variabilidade genética dentro da população, devido a expectativa teórica de baixos valores de fluxo gênico. Contudo, a variação genética entre populações foi pequena em relação à variação genética encontrada entre os indivíduos da mesma população. Assim, a eventual troca de informação genética que ocorre parece ser o bastante para ter homogeneizado as populações adultas.

7.2 Sistema Reprodutivo

Os valores obtidos para as estimativas das taxas de cruzamento encontram-se na Tabela 5. Os valores obtidos para as freqüências alélicas de óvulo e pólen encontram-se nas tabelas 6 e 7.

Tabela 5. Estimativas da taxa de cruzamento por família, multilocos (tm), unilocos (ts), entre aparentados (tm - ts), índice de fixação de Wright entre indivíduos maternos (F), correlação da estimativa de t (rt), correlação da estimativa de p (rp) e os correspondentes desvios padrões da média, entre parênteses.

	Caetetus (fragmento grande)	Ibicatú (fragmento pequeno)
Família 1	1,760 (0,420)	0,950 (0,500)
Família 2	1,670 (0,620)	0,530 (0,250)
Família 3	0,590 (0,570)	1,080 (0,440)
Família 4	1,650 (0,220)	1,090 (0,550)
Família 5	0,770 (0,400)	0,820 (0,310)
Família 6	0,290 (0,15)	1,470 (0,270)
Tm	0,991 (0,325)	1,080 (0,131)
Ts	0,940 (0,233)	1,127 (0,153)
Tm-ts	0,051 (0,123)	-0,047 (0,047)
F	-0,416 (0,269)	-0,773 (0,129)
Rt	0,990 (0,758)	-0,110 (0,649)
Rp	0,990 (0,240)	0,990 (0,001)

Tabela 6. Teste de c2 para aderência dos locos ao modelo multilocos e estimativas de máxima verossimilhança de freqüências alélicas dos óvulos e do pólen, contribuintes para o conjunto gênico das progêniés de *E. leiocarpa* da E.E. de Caetetus.

Loco	N	GL	Alelo	Pólen	Óvulos	χ^2
6Pgdh-2	110	1	1	0,972	0,923	1,33 (ns)
			2	0,028	0,077	
Mdh-3	110	1	1	0,991	0,917	3,43 (ns)
			2	0,009	0,083	
Mdh-4	85	2	1	0,953	0,857	
			2	0,036	0,071	3,41(ns)
			3	0,011	0,072	
Pgi-1	100	1	1	0,598	0,833	6,78 **
			2	0,402	0,167	
Est-1	91	3	1	0,100	0,071	
			2	0,489	0,571	2,80 (ns)
			3	0,400	0,286	
			4	0,011	0,072	
Prx-1	12	2	1	0,168	0,417	
			2	0,414	0,250	0,87 (ns)
			3	0,418	0,333	

Tabela 7. Teste de c2 para aderência dos locos ao modelo multilocios e estimativas de máxima verossimilhança de freqüências alélicas dos óvulos e do pólen, contribuintes para o conjunto gênico das progênieis de *E. leiocarpa* da E.E. de Ibicatú.

Loco	N	GL	Alelo	Pólen	Óvulo	χ^2
Mdh-1	100	1	1	0,990	0,923	2,70 (ns)
			2	0,010	0,077	
Mdh-3	69	1	1	0,938	0,917	0,11 (ns)
			2	0,062	0,083	
Mdh-4	---	-	-	-	-	7,58 *
		-	-	-	-	
		-	-	-	-	
Pgi-1	114	1	1	0,693	0,750	0,46 (ns)
			2	0,307	0,250	
Est-1	116	2	1	0,313	0,500	6,60 *
			2	0,239	0,250	
			3	0,448	0,250	
Prx-1	111	2	1	0,213	0,083	7,00 *
			2	0,196	0,417	
			3	0,591	0,500	
Skdh-1	120	1	1	0,992	0,923	3,51 (ns)
			2	0,008	0,077	

O valor obtido da taxa média de cruzamento unilocos para Caetetus (0,94) sugere a existência de alguma endogamia; como a espécie é auto-incompatível (CRESTANA et al., 1982), tal endogamia deve dar-se por cruzamento entre parentados. O valor encontrado para Ibicatú (1,127) demonstra apenas a existência de fecundação cruzada. Já as médias das estimativas multilocos mostraram valores próximos de 1 (0,991 para Caetetus e 1,080 para Ibicatú) levando a considerar a espécie preferencialmente de fecundação cruzada. A diferença entre as taxas unilocos e multilocos ($tm-ts$) possibilita a caracterização da ocorrência de endogamia. Os valores encontrados para $tm-ts$ mostram que a fecundação é preferencialmente cruzada. Os valores encontrados para as diferenças nas freqüências alélicas entre pólen e óvulo foram pequenos, indicando uma contribuição panmíctica do conjunto de pólen e óvulos nas populações em estudo.

7.4 Distribuição Espacial dos Genótipos

Os valores do índice I de Moran por classes de distância, para todos os alelos, nas quatro populações, oscilaram de positivos a negativos, flutuando sempre em torno de 0. Contudo, alguns valores foram significativamente diferentes de zero mas, sendo negativos, indicam que os indivíduos pareados são completamente diferentes e que a distribuição dos genótipos é aleatória.

Os resultados obtidos para a distribuição espacial dos fenótipos mostram que as subpopulações não estão estruturadas na forma de famílias. Portanto, a distribuição dos indivíduos nas subpopulações é aleatória, não havendo autocorrelação genética entre indivíduos espacialmente próximos. Deve-se considerar que, nesta análise, os indivíduos que foram considerados não próximos não estão distantes entre si mais que 50 metros.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A - A maior parte da variabilidade genética, tanto para adultos quanto para as progênies, encontra-se entre os indivíduos adultos dentro das subpopulações.

B - O estudo do sistema reprodutivo sugeriu ausência de endogamia, portanto, mostrando equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações e subpopulações de adultos.

C – A análise da distribuição espacial dos genótipos mostrou que a distribuição dos indivíduos nas subpopulações é aleatória.

D - A estimativa de fluxo gênico mostrou baixos valores, o que era esperado devido às síndromes de polinização e dispersão de sementes da espécie e à distância entre os fragmentos.

E - Os dados obtidos sugerem que quanto menos subpopulações existirem em um fragmento, mais a população estará sujeita à perda de variabilidade genética, o que poderá comprometer a sobrevivência local da espécie, no longo prazo.

F - A diferença entre os dados para os valores de diversidade e estrutura genética obtidos no fragmento grande e no pequeno foi pequena. Uma possível explicação é que, em ambos os fragmentos, estão sofrendo efeitos da fragmentação, assim não se podendo considerar o fragmento grande (cerca de 2 mil hectares) como floresta contínua. Na literatura, considera-se necessária uma área contínua de floresta madura de 500 mil hectares para fugir-se dos efeitos deletérios da fragmentação para as espécies raras, e talvez o mesmo seja verdadeiro para as espécies muito comuns, como *Esenbeckia leiocarpa*. Um estudo com uma amostragem mais abrangente poderá alcançar dados mais consistentes. Deve ser ressaltada, contudo, a inviabilidade de se trabalhar com senso em vez de amostragem, já que cada reboleira da espécie pode conter muitas dezenas de indivíduos adultos.

G - Para se obter melhores informações sobre a genética das populações da espécie em questão, alguns estudos adicionais podem ser sugeridos. Com os dados já obtidos, será interessante calcular o tamanho efetivo populacional, também estimando o tamanho de vizinhança. Para melhor compreender os efeitos da fragmentação sobre as populações estudadas, são bem elucidativas as simulações no computador, como as realizadas por SOUZA (1997). Estudos de genética quantitativa e com outros marcadores moleculares e a comparação dos resultados obtidos neste com os do presente experimento são possíveis e recomendadas.

9. REFERÊNCIAS

ABRAMS, R. W. Pelagic seabird community structure in the southern Benguela region (South Africa): changes in response to man's activities? **Biological Conservation**, v. 32, n. 1, p. 33-50, 1985.

ALFENAS, S. A.; PETERS, I. P.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e fngos em essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 241 p.

ALFENAS, S. A. **Eletroforese de proteínas e enzimas: princípios básicos e aplicações**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1986. 6 p. Apostila do Seminário sobre Propagação de Essências Florestais.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.

BANSE, G.; BEZZEL, E. Number of species and size of area in the breeding birds of Central Europe. **Journal Fuer Ornithologie**, v. 125 n. 3, p. 291-306, 1984.

BARRERA, A.; GÓMEZ-POMPA, A.; VÁSQUEZ-YANES, C. El manejo de la selva por los mayas: sus implicaciones silvícolas y agrícolas. **Biotica**, v. 2, n. 2, p. 47-61. 1977.

BAWA, K. S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, v. 28, p. 85-92. 1974.

BAWA, K. S.; PERRY, D. R.; BEACH, J. H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. 1.: sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal Botanic**, v. 72 n. 3, p. 331-45, 1985.

BERGAMASCO, A. Comportamento do Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.) frente à enxertia como método de propagação. Anais do Congresso Nacional sobre Essências Nativas. **Revista do Instituto Florestal**. Edição especial, p. 917-918. 1982.

BERGAMASCO, A. Comportamento do garantã (*Esenbeckia leiocarpa* Eng.) frente à enxertia com método de propagação. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 16-A, pt. 2, p. 917-918, 1982. Edição dos Anais do Congresso Nacional sobre Essências Nativas, 1982, Campos do Jordão.

BERKE, P. R.; BEATLEY, T. Sustaining Jamaica's forest: the protected areas conservation project. **Environmental Management**, v. 19, n. 4, p. 527-545, 1995.

BIERREGAARD, R. O. Jr.; LOVEJOY, T. E. Birds in Amazonian forest fragments: effects os insularization. In: CONGRESS INTERNACIONALIS ORNITHOLOGICI, 19., 1988, Ottawa. Acta...Ottawa: University of Ottawa Press, 1988. v. 2, 556 p.

BIERREGAARD, R. O., Jr; LOVEJOY, T. E.. Effects of forest fragmentation on Amazonian understory bird communities. **Acta Amazônica**, v. 19, p. 215-241,1989.

BIERREGAARD, R. O., Jr.; LOVEJOY,T. E.; KPOS, V.; SANTOS, A. A. dos; HUTCHINGS, R. W. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. **BioScience**, v. 42, n. 11, p. 124-136, 1992

BLEICH, V. C., WEHAUSEN, J. D.; HOLL, S. A. Desert-dwelling mountain sheep: conservation implications of a naturally fragmented distribution. **Conservation Biology**, v. 4, n. 4, p. 383-390, 1990.

BOITANI, L. Genetic considerations on wolf conservation in Italy. **Bulletino di Zoologia**, v. 51, p. 3-4, p. 367-374, 1984.

BRENNAN, E. J. De Brazza Monkeys (*Cercopithecus neglectus*) in Kenia: Census, distribution and conservation. **American Journal of Primatology**, v. 8, n. 4, p. 269-278, 1985.

BRYANT, C. R. The recent evolution of farming landscapes in urban-centered regions. **Landscape Planning**, v. 11, n. 4, p. 307-326, 1984.

BRYANT, C. R. Farmland conservation and farming landscapes in urban-centered regions: The case of Ile-de-France region (France). **Landscape and urban planning**, v. 13, n. 4, p. 251-276, 1986.

BUCKLEY, D. P.; O' MALLEY, D. M.; APSIT, V.; PRANCE, G. T.; BAWA, K. S. Genetics of Brasil nut (*Bertholletia excelsa* Humb.& Bonpl. Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. **Theoric and Applied Genetics**, v. 76, p. 923-928, 1988.

CHASE, M. R.; BOSHIER, D. H.; BAWA, K. S.. Population genetics of *Cordia alliadora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1- genetic variation in natural populations. **American Journal of Botany**, v. 82, n. 4, p. 468-475, 1995.

CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. **Techniques for starch gel eletrophoresis of enzymes from forest tree species.** Chalk River: Petawawa National Forestry Institute: CanadianForestryService, 1984. 49 p. (Information Report PI-X-42).

CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v. 30, n. 12, p. 814-18, 1980.

CONRY, P. J. *Gaur* *Borsgaurus* and development in Malasia. **Biological Conservation**, v. 49, n. 1, p. 47-66, 1989.

CORDER; M. R. M.; LOPES, C. R. Análise genética de padrões isoenzimáticos de *Eucalyptus spp* em diferentes estágios de desenvolvimento. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO E 7º CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 1.; CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993, Curitiba. **Política, ambiente, tecnologia e mercado:** anais. São Paulo: SBS; [S.I.]: SBEF, 1993. v. 1, p. 82-84.

COSTA, L. G. da S. **Estrutura e dinâmica de trecho de mata mesófila semidecídua, na Estação Ecológica de Ibiticatu, Piracicaba, SP.** 1992. 187 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biosciências, USP, São Paulo, São Paulo.

CRESTANA, C. de S. M.; DIAS, I. de S.; KAGEYAMA, P. Y. Biología floral do Guarantá (*Esenbeckia leiocarpa* Engl). **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 28, p. 35-38, 1983.

DMOWSKI, K.; KOZAKIEWICZ, C. S. Influence of a shrub corridor on movements of passerine birds to a lake littoral zone. **Landscape Ecology**, v. 4, n. 2-3, p. 99-108, 1990.

DUCOUSSO, A.; PETIT, D.; VALERO, M.; VERNET, P. Genetic variation between and within populations of a perennial grass: *Arrhenatherum elatius*. **Heredity**, v. 65, p. 179-188, 1990.

EIDE, S. H.; MILLER, S. D.; CHIHULY, M. A. Oil pipeline crossing sites utilized in winter by moose, *Alce alces*, and caribou, *Rangifer tarandus*, in Southern Alaska (USA). **Canadian Field Naturalist**, v. 100, n. 2, p. 197-207, 1986.

FEARNSIDE, P. M. Deforestation and international economic development projects in Brazilian Amazonia. **Conservation Biology**, v. 1, p. 214-221, 1987.

FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; CUNHA, N. L.; REIS, M. S.; KAGEYAMA, P. Y. **Eletroforese de Isoenzimas para Espécies Arbóreas:** manual de laboratório. Piracicaba, ESALQ, 1994. 22 p. Não publicado.

FRANKIE, G. W.; VINSON, S. B.; NEWSTROM, L. E.; BARTHELL, J. F.; HABER, W. A.; FRANKIE, J. K. Plant phenology, pollination ecology , pollinator behaviour and conservation of pollinators in neotropical dry forest. In: BAWA, K. S.; HADLEY, M. **Reproductive ecology of tropical forests plants.** [S.I.]:Unesco, 1990. p 37-47.

FOSTER, B.R.; RAHS, E.Y. A study of canyon-dwelling mountain goats in relation to proposed hydroelectric development in Northwestern British Columbia, Canada. **Biological Conservation**, v. 33, n. 3, p. 209-228, 1985.

GOMEZ-POMPA, A.; VAZQUEZ-YANES, S.; GUEVARA, S. The tropical rain forest: a nonrenewable resource. **Science**, v. 177, p. 762-765, 1972.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: ESALQ, 1990. 85 p.

GORLOV, V.D.; LOZANOVSKAYA, I. N. Biological-ecological criteria for land recultivation and their efficacy. **Pochvovedenie**, v. 10, p. 83-90, 1984.

GOVINDARAJU, D. R. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. **OIKOS**, v. 52, p. 31-35, 1988.

GRANT, V. Gene Flow and the homogeneity of species populations. **Biological Zentralblatt**, n. 99, p. 157-69, 1980.

GUNATILLEKE, C. V. S.; GUNATILLEKE, I. A. U. Phytosociology of Sinharaja: a contribution to rain forest conservation in Sri Lanka. **Biological Conservation**, v. 31, n. 1, p. 21-40, 1985.

GURGEL-FILHO, O. A.; MORAES, J. L.; GURGEL-GARRIDO, L. M. A.. Silvicultura de essências indígenas sob povoamentos homocíclicos experimentais. II- Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.). **Revista do Instituto Florestal**, v. 3, p. 847-851, 1982. Edição Especial.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON. **Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics**. Berkeley, CA: USDA Forest Service, Pacific Southwest Forest and Range, 1979. (USDA. For. Serv. Gen. Tech. Report, PSW-GTR-48).

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

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: association with reproductive biology. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y. B. (Ed.). **The evolutionary ecology of plants**. London: Westview Press, 1989. p. 129-146.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, v. 7, p. 395-399, 1991.

HAMRICK, J. L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. URBANSKA, K. M. (Ed.). **Differentiation patterns in higher plants**. New York: Academic Press, 1987. p. 53-67.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural forest populations. In: SHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBIDE, B; THOMAS, W. L. (Ed.). **Genetic and conservation**. New York: The Benjamin Cummings, 1983. p. 335-448.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, E.; FLEMING, I. (Ed.). **Frugivores and seed dispersal: symposium-workshop**. Dordrecht : Junk, 1986. p. 211-223.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon Neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, v. 7, p. 395-399, 1991.

HEINEN, K.; MERRIAM, G. The elements of connectivity where corridor quality is variable. **Landscape Ecology**, v. 4, n. 2-3, p. 157-170, 1990.

HERMAN, J. T.; GUBBELS, R.; SCHEPERS, F.; SHOLS, R.: The importance of the streams in South Limburg (Netherlands) for wildlife. **Nature Genetics**, v. 38, n. 1, p. 35-68, 1990.

HEYWOOD, J. S. Spatial Analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 22, p. 335-55, 1991.

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

HOMWOOD, K. M.; RODGERS, W.A . Pastoralism and conservation. **Human Ecology**, v. 12, n. 4, p. 431- 442, 1984.

HOMWOOD, K.; RODGERS, W. A.; ARHEM, K. Ecology of pastoralism in Ngorongoro Conservation Area, Tanzania. **Journal of Agricultural Science**, v. 108, n. 1, p. 47-72, 1987.

HOWE, H. F. The implications of seed dispersal by animals for tropical reserve management. **Biological Conservation**, v. 30, n. 3, p. 261-282. 1984.

HOWE, H. F.; SMALLWOOD, J. Ecology of seed dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 201-228, 1982.

JANZEN, D. H. An abandoned field is not a tree fall gap. **Vida Silvestre Tropical**, v. 2, n. 2, p. 64-67, 1990.

JOHNSINGH, A. J. T.; PRASAD, S. N.; GOYAL, S. P. Conservation status of the Chila-motichur corridor for elephant movement in Rajaji-Corbett National Parks Area, India. **Biological Conservation**, v. 51, n. 2, p. 125-138, 1990.

KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. F. A. Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. **IPEF**, Piracicaba. v. 41/42, p.83-93, 1989.

KAGEYAMA, P. Y.; FREIXÊDAS, V. M.; GERES, W. L. A.; DIAS, J. H. P.; BORGES, A. S. Consórcio de espécies nativas de diferentes grupos sucessionais em Teodoro Sampaio-SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, pt. 2, p. 527-533, mar. 1992. Edição dos Anais do Congresso Florestal de Essências Nativas, 2., 1992, São Paulo. Edição especial.

KAGEYAMA, P. Y.; SANTARELLI, E.; GANDARA, F. B.; GONÇALVES, J. C.; SIMIONATO, J. L.; ANTIQUEIRA, L. R.; GERES, W. L. Revegetação de áreas degradadas: Modelos de consorciação com alta diversidade. In: **SIMPÓSIO SUL-AMERICANO**, 1.; **SIMPÓSIO NACIONAL**, 2., 1994, Foz do Iguaçu. **Recuperação de áreas degradadas**: anais. Curitiba: FUPEF, 1994. p. 382-390.

KAGEYAMA, P. Y.; REIS, A.; CARPANEZZI, A. A. **Potencialidades e restrições da regeneração artificial na recuperação de áreas degradadas**. In: **SIMPÓSIO SUL-AMERICANO**, 1.; **SIMPÓSIO NACIONAL**, 2., 1994, Foz do Iguaçu. **Recuperação de áreas degradadas**: anais. Curitiba: FUPEF, 1994. p. 234-245.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. **Dinâmica de populações de espécies arbóreas: Implicações para o manejo e a conservação**. In: **SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA**, 3., 1993. **Anais...** São Paulo: ACIESP, 1994. p. 26-38.

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

KAPOS, V. Effects of isolation on the water status of forest patches in the Brazilian Amazon. **Journal of Tropical Ecology**, v. 5, p. 173-185, 1989.

KARTAWINATA, K. The use of secondary forest species in rehabilitation of degrade forest lands. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 7, n. 1, p.76-86, 1994.

KEPHART, S. R. Starch gel eletrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, v. 77, n. 5, p. 693-712, 1990.

KHAIR, A.; KHAN, M. A. A.; RAHMAN, M. A. Selection of some tree species for soil conservation in the hills of Chittagong University Campus (Bangladesh). **Chittagong University Studies Part II. Science**, v. 8., n. 1, p. 95-98, 1984.

KHEMNARK, C. Rehabilitation of degraded tropical forest land through agroforestry practices: a case study in Thailand. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 7, n. 1, p. 128-135, 1994.

LAMB, D. Reforestation of degraded tropical forest lands in the Asia - Pacific Region. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 1994.

- LAMB, D.; TOMLINSON, M. Forest rehabilitation in Asia-Pacific region: past lessons and present uncertainties. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 7, n. 1, p. 157-170, 1994.
- LI, C. C.; HORVITZ, D.G. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **American Journal of Human Genetics**, v. 5, p. 107-117, 1953.
- LANH, L. V. Establishment of ecological models for rehabilitation of degraded barren Midland land in Northern Vietnam. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 7, n. 1, p. 1143-156, 1994.
- LAURANCE, W. F. Comparative responses of five arboreal marsupials to tropical forest fragmentation. **Journal of Mammalogy**, v. 71, n. 4, p. 641-653, 1990.
- LIEBERMAN, M.; LIEBERMAN, D.; PERALTA, R.; HARTSHORN, G. S. Canopy closure and the distribution of tropical forest tree species at La Selva, Costa Rica. **Journal of Tropical Ecology**, v. 11, n. 2, p. 161 -178, 1995.
- LOISELLE, B.A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, 1995.
- LORENZ, G. C.; BARRETT, G. W. Influence of simulated landscape corridors on house mouse (*Mus musculus*) dispersal. **American Midland Naturalist**, v. 123, n. 2, p. 348-356, 1990.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum. 1992. 302 p.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Distribución de la Variación en Espécies de Arboles Tropicales. **Revista Biología Tropicales**, v. 35, n. 1, p. 165-75, 1987.
- LUGO, A. E.. Cities in the sustainable development of tropical landscapes. **Nature Resources**, v. 27, n. 2, p. 27-35, 1991.
- MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. An equilibrium theory of insular zoogeography. **Evolution** v. 17, p. 373-387.1963.
- MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. **The theory of islands biogeography**. Princeton: Princeton Press, 1967. 476 p.
- MAJID, N. M.; HASHIM, A.; ABDOL, I. The rehabilitation of ex-tin mining land by agroforestry practice. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 7, n. 1, p. 113-127, 1994.

MANSERGH, I. M.; SCOTTS, D. J. Habitat continuity and social organization of the mountain pygmy-possum restored by tunnel. **Journal of Wildlife Management**, v. 53, n. 3, p. 701-707, 1989.

MARCON, G. **Eletroforese no estudo genético de plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1986. 43 p.

MARCON, G. **Estrutura genética de populações de *Stylosantes humilis* H.B.K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco**. 1988. 179 f. Tese(Doutorado) - Instituto de Genética, ESALQ, Piracicaba.

McCORMACK, D. E. Legislating soil reconstruction on surface-mined land in USA. **Mineral and the environment**, v. 6, n. 4, p. 154-156, 1984.

MENGES, E. S. Population viability analysis for an endangered plant. **Conservation Biology**, v. 4, n. 1, p. 52-62, 1990.

MENGES, E. S.; GAWLER, S. C. Four-year changes in population size of endemic Furbish's lousewort (*Pedicularis furbishiae*): implications for endangerment and management. **Natural Areas Journal**, v. 6, n. 1, p. 6-17, 1986.

MERRIAM, G.; LANOUE, A. Corridor use by small mammals: field measurement for three experimental types of *Peromyscus leucopus*. **Landscape Ecology**, v. 4, n. 2-3, p. 123-132, 1990.

MIYAWAKI, A.; FUJIWARA, K.; BOX, E. O. Toward harmonious green urban environments in Japan and other countries. **Bulletin of Institute of Environment Science Technology**, v. 14, p. 67-82, 1987.

MORAES, M. L. T. **Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* F.F.; M.F. Allemão - Anarcadiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* FR Allemão Engler)**. 1993. 153 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Genética, ESALQ, Piracicaba.

MORAN, G. F.; MUONA, O.; BELL, J. C. *Acacia Mangium*: A tropical forest tree of the coastal lowlands with low genetic diversity. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 231-235, 1989.

MURAWSKI, D. A.; BAWA, K. S. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **American Journal of Botany**, v. 81, n. 2, p. 155-160, 1994.

MURAWSKI, D. A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K. S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forests. **Biotropica**, v. 26, n. 1, p. 23-29, 1994.

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

MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J. L.; HUBBEL, S.P.; FOSTER, R.B. Mating systems of two bombacaceous trees of a neotropical moist forest. **Oecologia**, v. 82, p. 501-506, 1990.

MYERS, N. Tropical forests: present status and future outlook. **Climate Change**, v. 19, n. 3-32, 1991.

NAKATSU, T.; JOHNS, T.; KUBO, I.; MILTON, K.; SAKAI, M.; CHATANI, K.; SAITO, K.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKWAWA, T. Isolation, structure and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from Esenbeckia leiocarpa. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1508-1513, 1990.

NAMKOONG, G.; GREGORIUS, H. R.. Conditions for protected polymorphisms in subdivided plant populations. 2-Seed versus pollen migration. **American Naturalist**, v. 125, n. 4, p. 521-534, 1985.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the Natural Academic Science**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NEI, M. Molecular population genetics and evolution. In: NEUBERGER, A.; TATUM, E. L. (Ed.) **Frontiers of Biology**. New York: Elsevier, 1975. v. 40, p. 34-46.

NEWMARK, W. D. Legal boundaries of western North American national parks: a problem of congruence. **Biological Conservation**, v. 33, n. 3, p. 197-208, 1985.

PERNETTA, J. C.; HILL, L. Tradicional use and conservation of resources in the Pacific basin. **AMBIO**, v. 13, n. 5-6, p. 359-364, 1984.

PRICE, M. V.; LONGLAND, W. S. Use of artificial seed patches by heteromyid rodents. **Journal of Mammalogy**, v. 70, n. 2, p. 316-322, 1989.

RANKIN-DE-MERONA, J. M.; HUTCHINGS, R.W.; LOVEJOY, T. E. Tree mortality and recruitment over a five year period in undisturbed upland rainforest of the Central Amazon. In: GENTRY, A. **Four neotropical rainforests**. New Haven: Yale University Press, 1990. p. 573-584.

RAMAKRISHNAM, P. S. Rehabilitation of degraded lands in India: Ecological and social dimensions. **Journal of Tropical Forest Science**, v 7, n. 1, p. 39-63, 1994.

REIS, M. S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpes edulis* M.). Piracicaba. 1996. 203 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Genética, ESALQ, Piracicaba.

REX, K. D.; MALANSON, G. P. The fractal shape of riparian forest patches. *Landscape Ecology*, v. 4, n. 4, p. 249-258, 1990.

RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. *Journal of Heredity*, v. 81, p. 235-237, 1990.

RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y. A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 71, p. 375-384, 1985.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, v. 47, n. 1, p. 35-52, 1981.

SANTOS, P. S. Fragmentação de habitats: implicações para a conservação in situ. *Oecologia Brasiliensis*, v. 1, n. 1, p. 264-289, 1995.

SAUNDERS, D. Problems of survival in a extensively cultivated landscape: the case of Carnaby's cockatoo *Calyptorhynchus funereus latirostris*. *Biological Conservation*, v. 54, n. 3, p. 277-290, 1990.

SCHROEDER, P. Organic matter cycling by tropical agroforestry systems: a review. *Journal of Tropical Forest Science*, v. 7, n. 3, p. 462-474, 1995.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. Estação Ecológica de Caetetus. Série Áreas Naturais, IPEF. 1987. 25 p.

SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. *Global biodiversity outlook 2*. Montreal, 2006. 89 p.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M. S.; BAWA, K. S.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. *Revista do Instituto Florestal*, v. 17, n. 1, p. 24-43, 2005.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. *Scientia Forestalis*, v. 69, p. 13-24, 2005.

SEOANE, C. E. S.; RIBEIRO, A.; SEBBENN, A. M. Ocorrência e conservação de *Euterpe edulis* Martius na região central do estado do Rio de Janeiro. *Floresta e Ambiente*, 2006. Submetido para publicação.

SIMBERLOFF, D. S.; ABELE, L. G. Island biogeography theory and conservation practice. **Science**, v. 191, p. 285-286, 1976.

SHAW, D. V.; ALLARD, R. W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 62, p. 113-120, 1981.

SHEPHERD, A. The Christmas Island Rehabilitation Programme. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 7, n. 1, p. 18-27, 1994.

SHIMIZU, M. Environmental conservation for economic development in Asia and the Pacific region. **Proceedings of the Faculty of Agriculture Kyushu Tokai University**, v. 3, p. 75-91, 1984.

SILVA, J. M. C. da. Aspectos da ecologia e comportamento de formicívora G. Grisea (Boddaert, 1789) (Aves: Formicariidae) em ambientes amazônicos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 48, n. 4, p. 797-806, 1988.

SMART, N; HATTON, J. C.; SPENCE, D. H. N. The effect of long term exclusion of large herbivores on vegetation in Murchison Falls National Park, Uganda. **Biological Conservation**, v. 33, n. 3, p. 229-246, 1985.

SOKAL, R. R.; ODEN, N. L. Spatial Autocorrelation in Biology: methodology. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 10, p. 199-228, 1978a.

SOKAL, R. R.; ODEN, N. L. Spatial autocorrelation in biology: some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interseta. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 10, p. 229-49, 1978b.

SOERINEGARA, I; MANSURI. Factors which determine the success in Gunung Kidul, Central Java. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 1, p. 64-75, 1994.

SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. **Biosys-1**: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Illinois: Illinois Natural History Survey, 1989. Release 1.7.

SZACKI, J. Ecological corridor as a factor determining the structure and organization of a bank vole population. **Acta Theriologica**, v. 32, n 1-10, p. 31-44, 1987.

TABACCHI, E.; PLANTY-TABACCHI, A. M.; DECAMPS, O. Continuity and discontinuity of the riparian vegetation along a fluvial corridor. **Landscape Ecology**, v. 5, n. 1, p. 9-20, 1990.

TABARELLI, M.; GASCON, C. Lessons from fragmentation research:improving management and policy guidelines for biodiversity conservation. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 734-739, 2005.

TERBORGH, J. The role of felid predators in neotropical forests. **Vida Silvestre Tropical**, v. 2, n. 2, p. 3-5, 1990.

TERBORGH, J. Maintenance of diversity in tropical forests. **Biotropica**, v. 24, p. 283-292, 1986.

THIOLLAY, J. M. The role of traditional agroforests in the conservation of rain forest birds in Sumatra. **Conservation Biology**, v. 9, n. 2, p. 335-353, 1995.

THOMAS, T. R.; IRBY, L. R. Habitat use and movements Patterns by migrating mule deer in southeastern Idaho (USA). **Northwest Science**, v. 64, n. 1, p. 19-27, 1990.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas**: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p. (Série Monografias, 1).

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Revista Brasileira de Genética**, v. 15, n. 1, 53-60, 1992.

VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, n. 3, p. 349-51, 1994.

VENCOVSKY, R. Estimadores de diversidade. In: KAGEYAMA, P. Y.; REIS, M. S.; GANDARA, F. B. **Estimação de variação genética e taxa de cruzamento em populações arbóreas**. Piracicaba: ESALQ, 1993. 82 p. Não publicado.

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. J. A.; MARTINEZ, J. L. A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, pt. 2, p. 400-406, 1992. Edição dos Anais do Congresso Florestal de Essências Nativas, 2., 1992, São Paulo.

VIEDMA, M. G. de; ESCRIBANO, R.; GOMEZ-BUSTILLO, M. R.; MATTONI, R. H. T. The 1st attempt to establish a nature reserve for the conservation of lepidoptera in Spain. **Biological Conservation**, v. 32, n. 3, p. 255-276, 1985.

WANG, J. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. **Conservation Biology**, v. 18, n. 2, p. 332-343, 2004.

WOOD, P.A.; SAMWAYS, M. J. Landscape element pattern and continuity of butterfly flight paths in an ecologically landscaped botanic garden, Natal, South Africa. **Biological Conservation**, v. 58, n. 2, p. 149-166, 1991.

WORKMAN, P.; NISWANDER, J. L. Population studies on Southwestern Indian tribes. II.: genetic differentiation in the Papago. **American Journal of Human Genetics**, v. 22, p. 24-49,

WRIGHT, J. A. **Conservación ex situ de especies nativas en Colombia.** Cali: Smurfit Cartón de Colombia, 1993. 6 p. (Informe de investigación, nº 159).

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

WEIR, B. S. **Genetic data analysis:** methods for discrete population genetic data. Sunderland: North Caroline State University, 1990. 377 p.

WRIGHT, S. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics**, v. 31, p. 39-59, 1946.

YOUNG, A. G., BOSIER, D.; BOYLE, T. J. **Forest conservation genetics:** principles and practice. Wallingford:CABI, 2000. 352 p.

YUE, Y. Z.; HAO, W. Z.; YI, H. S. Rehabilitation of eroded tropical coastal land in Guandong, China. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 7, n. 1, p. 28-38, 1994.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para a revelação dos sistemas isoenzimáticos de *E.*

leiocarpa:

Tabela 8. Dados das corridas eletroforéticas realizadas com limbos foliares de *E. leiocarpa*.

V inicial no gel	10V
V inicial na fonte	120 a 170V
V final no gel	18 a 32V
V final máxima na fonte	200 a350V
I inicial	25 a 40 mA
I final	25 a 40 mA
Tempo de corrida	6 a 8 horas

Tabela 9. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático a-EST para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Solução A:	
a-Naftil Acetato (40 mg/ml de acetona 50 %)	1 ml
Tampão Fosfato de Sódio 0,05 M pH 6.0	40 ml
Solução B:	
Fast Garnet GBC (30 mg/ml de n-propanol)	2 ml
Tampão Fosfato de Sódio 0.05 M pH 6.0	40 ml
Procedimento:	
Imergir o gel na solução A por 20 minutos, em seguida adicionar a solução B. Temperatura: 37 °C	

Tabela 10. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático G6PDH para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Ácido 6-fosfoglucônico, Na3	20 mg
NADP	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
MgCl ₂ (1 %)	1 ml
Tris Hcl 0,1 M, pH 8,0	50 ml
Procedimento:	
Inocular no escuro, por 15-30 minutos a 30-37 °C.	

Tabela 11. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático MDH para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Ácido Málico: DL - Ácido málico Água destilada	10 g 80 ml
Procedimento: Ajustar o pH 8,0 com NaOH 1M, completar o vol. com 100 ml	
Produto	Quantidade
Ácido Málico 0,5M pH 8,0	4 ml
NAD	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
Tris Hcl 0,1M pH 8,5	50 ml
Procedimento: Inocular o gel no escuro, por 15-60 min em estufa a 37 °C.	

Tabela 12. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático PRX para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
O-Dianisidina	30 mg
Etanol	25 ml
Tampão acetato de sódio pH 5,0 (0,2M)	25 ml
H ₂ O ₂ (30 %)	1,5 ml
Procedimento: Agitar o Etanol e a Dianisidina, adicionar o tampão, inocular por 20 min em estufa a 37 °C e adicionar 2,0 ml de H ₂ O ₂ (3 %)	

Tabela 13. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático SKDH para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Ácido Xiquímico	50 mg
NADP	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
Tris Hcl 0,1 M pH 8,5	50 ml
Procedimento: Inocular o gel no escuro, durante 30 a 60 min em estufa a 37 °C.	

Tabela 14. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático PGI para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Frutose-6-fosfato	37,5 mg
MTT	1 ml
Tris - Hcl 0,1 M, pH 8,0	50 ml
Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	0,01 ml
PMS	1 ml
MgCl ₂ (1 %)	1 ml
NADP	1 ml
Procedimento: Adicionar G6PDH por último, incubar no escuro em estufa a 37 °C.	

Tabela 15. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático IDH para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
DL-Ácido isocítrico, Na3	100 mg
NADP	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
MgCl2 (1 %)	1 ml
Tris Hcl 0,1 M pH 8,0	50 ml
Procedimento: Inocular o gel no escuro, por 15-20 min. em estufa a 37 °C.	

Tabela 16. Protocolo para obtenção de zimogramas para o sistema isoenzimático PGM para *E. leiocarpa*.

Produto	Quantidade
Glucose - 1 - fosfato, Na2	125 mg
EDTA	25 mg
NADP	1 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml
MgCl2 (1%)	1 ml
Tris Hcl 0,1 M pH 8,5	50 ml
Glucose- 6 fosfato desidrogenase	0,02 ml
Procedimento: Adicione G6PDH por último. Ponha no escuro em estufa a 37 °C.	

Anexo 2

Tabela 17. Índices de diversidade para espécies da Mata Atlântica e outras espécies tropicais. N1-Número de locos analisados. Np - Número de populações estudadas. P - Percentagem de locos polimórficos. A - Número médio de alelos por loco. Ht - Diversidade genética (heterozigosidade) total. Hp- Diversidade genética dos locos polimórficos.

Espécie	N1	Np	P	A	Ht	Hp	Nicho / local	Autor
<i>Cariniana legalis</i>	-	3	-	-	0,140	0,468	Emergente/ Mata Atlântica	Herrit (1991)
<i>Chorisia speciosa</i>								
<i>Aspidosperma Polyneuron</i>	7	2	50	1,94			Dossel/ Mata Atlântica	Maltez(1997)
<i>Cedrela fissilis</i>								
<i>Genipa americana</i>								
<i>Euterpe edulis</i>								
<i>Aghatis borneensis</i>	17	6	27,8	1,41	0,122	-	Dossel, comum / Bornéo	Kitamura; Rahman, 1992
<i>Carapa guianensis</i>	16	9	35,0	1,18	0,120	0,310	Comum, dossel / Costa Rica	Hall et al, 1994
<i>Acrocomea aculeata</i>	12	10	100,0	2,0	0,375	0,375	Dossel/ Cerrado	Lopes et al, 1992
<i>Psychotria faxlucens</i>	20	2	40,0	2,5	0,198	0,495	Sub-bosque, comum/Mexico	Perez- Nasser et al, 1993

Anexo 3

Tabela 18. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficientes I de Moran), para classes de distância, em cinco alelos de locos isoenzimáticos na subpopulação 1 de *E. leiocarpa*.

Loco		Classe de Distância		
		Alelo 1	2	3
Pgi1	1	-0,032	-0,137	-0,042
Est1	1	-0,206	-0,005	-0,015
	2	-0,236	0,039	-0,077
Prx1	1	0	-0,176	0
	2	-0,216	0,029	-0,1
Nº de Comparações		30	37	11

Tabela 19. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficientes I de Moran), para classes de distância, em cinco alelos de locos isoenzimáticos na subpopulação 2 de *E. leiocarpa*.

Loco		Classe de Distância	
		Alelo 1	2
Pgi1	1	0,1	-0,12
Est1	1	-0,228	0,003
	2	-0,041	-0,152
Prx1	1	0,086	-0,221
	2	-0,235	0,008
Nº de Comparações		19	30

Tabela 20. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficientes I de Moran), para classes de distância, em 7 alelos de locos isoenzimáticos na subpopulação 3 de *E. leiocarpa*.

Loco	Alelo	Classe de Distância				
		1	2	3	4	5
Mdh3	1	0,143	-0,048	-0,158	-0,07	-0,429
Pgi1	1	-0,134	0,018	-0,122	0,078	-0,379
	1	-0,114	-0,053	-0,077	0,19	-0,4
Est1	2	-0,214	0,003	0,1	-0,048	-0,25
	1	-0,155	0,148	-0,159	-0,23	-0,452
Prx1	2	-0,168	0,033	-0,04	-0,22	-0,041
		35	76	52	21	5
Nº de Comparações						

Tabela 21. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficientes I de Moran), para classes de distância, em nove alelos de locos isoenzimáticos na subpopulação 4 de *E. leiocarpa*.

Loco	Alelo	Classe de Distância		
		1	2	3
Mdh1	1	0,048	-0,51	0,077
Mdh3	1	-0,001	-0,343	0,014
Pgi1	1	0,169	-0,222	-0,287
	2	-0,189	-0,212	0,151
Est1	1	-0,03	-0,093	-0,133
	2	-0,133	0,008	-0,04
Prx1	1	-0,126	0,212	-0,226
	2	-0,126	0,212	-0,226
	3	-0,189	0,058	-0,021
Nº de Comparações		37	22	31