

ISSN 0103-2674



SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO FLORESTAL



# REVISTA DO INSTITUTO FLORESTAL

Rev. Inst. Flor.	São Paulo	v. 16	n. 2	p. 83 - 164	dez. 2004
------------------	-----------	-------	------	-------------	-----------

## SUMÁRIO/CONTENTS

	p.
Análise genética de fenótipos isoenzimáticos e desequilíbrio de ligação em <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All. Genetic analysis of isoenzymes phenotypes and linkage disequilibrium in <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All. Mario Luiz Teixeira de MORAES; Selma Maria Bozzite MORAES; Alexandre Magno SEBBENN; Paulo Yoshio KAGEYAMA .....	83-90
Variação genética em cinco procedências de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze. no sul do Estado de São Paulo. Genetic variation in five provenances of <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze. in south of São Paulo State. Alexandre Magno SEBBENN; Ananias de Almeida Saraiva PONTINHA; Sivaldo Alves de FREITAS; José Antonio de FREITAS..	91-99
Herança e ligação em locos isoenzimáticos de <i>Caesalpinia echinata</i> L. (pau-brasil). Inheritance and linkage in isozyme loci of <i>Caesalpinia echinata</i> L. (pau-brasil). João del GIUDICE-NETO; Alexandre Magno SEBBENN; Paulo Yoshio KAGEYAMA .....	101-110
Herança e desequilíbrio de ligação em sete locos isoenzimáticos de <i>Cecropia pachystachya</i> . Inheritance and linkage disequilibrium in seven isozymes loci of <i>Cecropia pachystachya</i> . Luciano Arruda RIBAS; Alexandre Magno SEBBENN .....	111-119
Pteridófitas do Parque Estadual de Vassununga, Santa Rita do Passa Quatro (SP), Brasil. Gleba Pé-de-Gigante. Pteridophytes from Vassununga State Park, Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brazil. Gleba Pé-de-Gigante. Áurea Maria Therezinha COLLI; Sonia Aparecida de SOUZA; Alexandre SALINO; André Luís Teixeira de LUCCA; Rogéria Toler da SILVA .....	121-127
Herança e desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos de <i>Eschweilera ovata</i> . Inheritance and linkage disequilibrium in allozymes loci of <i>Eschweilera ovata</i> . Eduardo GUSSON; Alexandre Magno SEBBENN .....	129-136
Herança e ligação em isoenzimas de <i>Tabebuia cassinoides</i> . Inheritance and linkage of isozymes of <i>Tabebuia cassinoides</i> . Alexandre Magno SEBBENN; Carlos Eduardo Sícoli SEOANE .....	137-145
Pteridófitas da Floresta Estadual de Bebedouro, SP, Brasil. Pteridophytes from Bebedouro State Forest, SP, Brazil. Áurea Maria Therezinha COLLI; Alexandre SALINO; Alessandro Chagas FERNANDES; Clayton Martins RANGEL; Ricardo Alexandre BARBOSA; Rogério Aparecido CORREA; Wagner Fernando da SILVA .....	147-152
Estrutura genética espacial em populações de <i>Tabebuia cassinoides</i> por locos isoenzimáticos. Spatial genetic structure in <i>Tabebuia cassinoides</i> populations by isozyme loci. Mário CAVALLARI NETO; Alexandre Magno SEBBENN; Carlos Eduardo Sícoli SEOANE; Paulo Yoshio KAGEYAMA .....	153-164

# ANÁLISE GENÉTICA DE FENÓTIPOS ISOENZIMÁTICOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.<sup>1</sup>

Mario Luiz Teixeira de MORAES<sup>2</sup>  
Selma Maria Bozzite MORAES<sup>2</sup>  
Paulo Yoshio KAGEYAMA<sup>3</sup>  
Alexandre Magno SEBBENN<sup>4</sup>

## RESUMO

A herança e o desequilíbrio de ligação foram estudadas em seis locos polimórficos (*Got-1*, *Got-2*, *Lap-1*, *6pgdh-1*, *Pgi-2* e *Pgm-1*) de cinco sistemas isoenzimáticos (GOT, LAP, PGI, 6PGD e PGM) revelados em 55 progênies de polinização aberta de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira) do Estado de São Paulo. A relação de ligação entre locos foi estudada pela medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows. A segregação para os locos foi geralmente homogênea entre árvores. No loco *Got-1* foi detectado desvio da razão de segregação esperada 1:1. Evidências de desequilíbrio de ligação foram observadas entre os locos: *Lap-1:Pgi-2*.

Palavras-chave: segregação; herança; desequilíbrio de ligação; isoenzimas; aroeira; espécies arbóreas tropicais.

## 1 INTRODUÇÃO

A análise de isoenzimas é uma ferramenta útil para caracterizar a estrutura de populações e acessar relações evolutivas em nível de espécies. A interpretação de medidas de variação, fluxo gênico, mutação e outros parâmetros genéticos requerem que modelos de herança e relação de ligação entre locos sejam determinados (Morgante *et al.*, 1993).

As espécies florestais mais pesquisadas, sob o aspecto genético, são as coníferas. Porém, mesmo para essas espécies a quantidade de informações sobre ligação gênica ainda é muito pequena.

## ABSTRACT

Inheritance and linkage disequilibrium were studied in six polymorphic enzyme loci (*Got-1*, *Got-2*, *Lap-1*, *6pgdh-1*, *Pgi-2* and *Pgm-1*) from five isozymes systems (GOT, LAP, PGI, 6PGD e PGM) in 55 open-pollinated families of two *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira) populations of São Paulo State. Burrows composite measure of linkage disequilibrium was used to study linkage relationship between loci. Gene segregation of loci was generally homogeneous among trees. *Got-1* locus showed significant departure from the expected 1:1 segregation ratio. Linkage disequilibrium evidence was detected between a pair of loci: *Lap-1:Pgi-2*.

Key words: segregation; inheritance; linkage disequilibrium; isozymes; aroeira; tropical tree species.

Ressalta-se, no entanto, que as associações entre locos não são facilmente mantidas, tal como ocorre para a maioria das espécies em que predomina a fecundação cruzada. Também é raro, em espécies florestais, o desequilíbrio gamético entre pares de locos não ligados. Essa ausência freqüente de desequilíbrio de ligação, que ocorre nas espécies florestais, torna impossível que se encontre associações entre locos marcadores específicos e locos que controlam caracteres quantitativos. Desse modo, a seleção indireta por marcador genético bioquímico (isoenzimas) não deve ser eficiente. Tais colocações foram feitas por Torggler *et al.* (1995) em extensa revisão bibliográfica sobre o assunto.

(1) Aceito para a publicação em agosto de 2004.

(2) FEIS/UNESP, Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia, Av. Brasil Centro, 56, 15385-000, Ilha Solteira, SP, Brasil.

(3) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

(4) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

*Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira) é uma espécie arbórea tropical dióica de ampla distribuição no Brasil, ocorrendo também na Argentina, Bolívia e Paraguai. Seu habitat é a floresta estacional semidecidual, a floresta estacional decidual, o cerrado, o cerradão, a caatinga, o chaco sul-mato-grossense e o pantanal mato-grossense. A espécie tem ampla utilidade. Sua madeira é utilizada para diversos fins como vigamento de pontes, postes, dormentes, moirões, etc. A planta é utilizada como ornamental, apícola, forrageira e para reflorestamentos ambientais (Carvalho, 1994).

O objetivo deste trabalho foi investigar a herança e o desequilíbrio de ligação entre seis locos polimórficos, revelados em cinco sistemas isoenzimáticos, de duas populações naturais de *M. urundeuva*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

Sementes de polinização aberta foram coletadas em 25 a 30 árvores de duas populações naturais de *M. urundeuva*: Estação Ecológica do Instituto Florestal em Paulo de Faria – SP (Latitude 19°55'S, Longitude 49°31'W), e Selvíria – MS (Latitude 20°19'S, Longitude 49°31'W).

De cada árvore matriz foram analisados, via eletroforese de isoenzimas, tecidos foliares de 20 plântulas. O genótipo das árvores maternas foi estimado a partir da composição genotípica de suas progênes, usando o método de máxima verossimilhança de Brown & Allard (1970), implementado no programa MLTR de Ritland (1998).

### 2.2 Eletroforese de Isoenzimas

As enzimas foram extraídas dos tecidos foliares das plântulas, empregando-se aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil Polipirrolidona e 200 µL da solução de extração número 1 (Alfenas, 1998). A eletroforese foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30). Os extratos de cada amostra eram embebidos em pedaços de papel filtro (Whatman nº 3), tendo 1,0 cm de comprimento por 0,6 cm de largura, sendo colocados em seguida no gel. O tampão do eletrodo foi o ácido cítrico 0,04 M, sendo titulado com citrato morfolina [N-(3-amino-propil)-morfolina] até atingir pH 6,10, e o do gel o mesmo tampão, mas diluído na proporção de 1:20. As demais condições de corrida são semelhantes às descritas por Lacerda *et al.* (2001) para a aroeira. As isoenzimas reveladas encontram-se esquematizadas na TABELA 1.

TABELA 1 – Sistemas enzimáticos investigados para herança em *M. urundeuva*.

Sistemas enzimáticos (Abreviações) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados
Aspartato aminotransferase (AAT) [= Glutamato oxaloacetato trasaminase (GOT)]. I.U.B. L-Aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferase. E.C. 2.6.1.1	A	2
	B	2
Leucina aminopeptidase (LAP) E.C. 3.4.11.1	A	3
Fosfogluco isomerase (PGI) E.C. 5.3.1.9	A	1
	B	3
Fosfoglucomutase (PGM) E.C. 5.4.2.2	A	1
	B	2
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) E.C. 1.1.1.44	A	2

## 2.3 Análise de Segregação

No presente estudo não foram realizados cruzamentos controlados para a avaliação da herança isoenzimática de *M. urundeuva*. Assim, adotou-se o método descrito por Gillet & Hattemer (1989), que compara árvores maternas heterozigotas com a segregação de suas progênes de polinização aberta. As pressuposições do modelo de Gillet & Hattemer (1989) são que toda a progênie de uma árvore materna  $A_iA_i$  deve possuir o alelo  $A_i$  da árvore mãe. Em casos de uma árvore mãe heterozigota (ex.  $A_iA_j$ ,  $i \neq j$ ) tem-se as situações: a) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna,  $A_i$  ou  $A_j$ ; b) o número de progênes heterozigotas  $A_iA_j$  ( $N_{ij}$ ) deve ser igual à soma das progênes homozigotas  $A_iA_i$  ( $N_{ii}$ ) e  $A_jA_j$  ( $N_{jj}$ ),  $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ , e c) o número de progênes heterozigotas  $A_iA_k$  ( $N_{ik}$ ) deve ser igual ao número de progênes heterozigotas  $A_jA_k$  ( $N_{jk}$ ),  $N_{ik} = N_{jk}$  ( $k \neq i, j$ ). A análise genética foi realizada com 20 plântulas por progênie, coletadas de 55 árvores matrizes, seguindo a análise de segregação proposta por Mather (1963). Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1, usando um teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) padrão (com correção de Yates), com um grau de liberdade. Em seguida, os fenótipos observados foram somados e um teste de qui-quadrado agrupado para a segregação 1:1 foi obtido ( $\chi^2_{1:1 \text{ Agrupado}}$ ), com um grau de liberdade. A hipótese nula desse teste é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de genótipo heterozigoto. Simultaneamente, todos os testes de qui-quadrado individuais foram somados, subtraindo-se em seguida desse total o valor de qui-quadrado agrupado, obtendo-se um teste de qui-quadrado de heterogeneidade ( $\sum \chi^2_{\text{Heterogeneidade}}$ ) de segregação entre progênes. Este último teste de qui-quadrado teve  $n-1$  grau de liberdade (Mather, 1963). Nesse estudo, designaram-se os locos com letras e números e os alelos com números, em ordem decrescente de migração do ânodo para o cátodo.

## 2.4 Desequilíbrio de Ligação

O teste de ligação foi analisado, utilizando-se a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\Delta_{ij}$ , Weir, 1979). A hipótese nula de equilíbrio de ligação ( $\Delta_{ij} = 0$ ) foi testada com o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) descrito em Weir (1979). As estimativas de desequilíbrio de ligação foram obtidas com auxílio do programa POPGENE versão 1.32 (Yeh & Yang, 1999).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Padrões das Isoenzimas

Todos os seis locos, revelados nos cinco sistemas isoenzimáticos, foram polimórficos e segregaram de dois a três alelos cada. Nesses também foram detectadas árvores matrizes heterozigotas em todos os locos, assim, foi possível a avaliação de sua herança e segregação. As descrições dos padrões de herança, segregação e desequilíbrio de ligação dos locos são apresentadas a seguir.

#### *Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)*

O sistema GOT apresentou duas zonas de atividade (*Got-1* e *Got-2*) enzimática (FIGURA 1), segregando dois alelos em cada zona. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos evidenciava a presença de três bandas nos géis, o que indica tratar-se de um loco controlado por uma enzima dimérica.

#### *Leucina aminopeptidase (LAP)*

A enzima LAP apresentou uma zona de atividade (FIGURA 1), interpretada como um loco (*Lap-1*) polimórfico, segregando três alelos. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos indica que esse loco é monomérico, com indivíduos heterozigotos apresentando duas bandas nos géis.

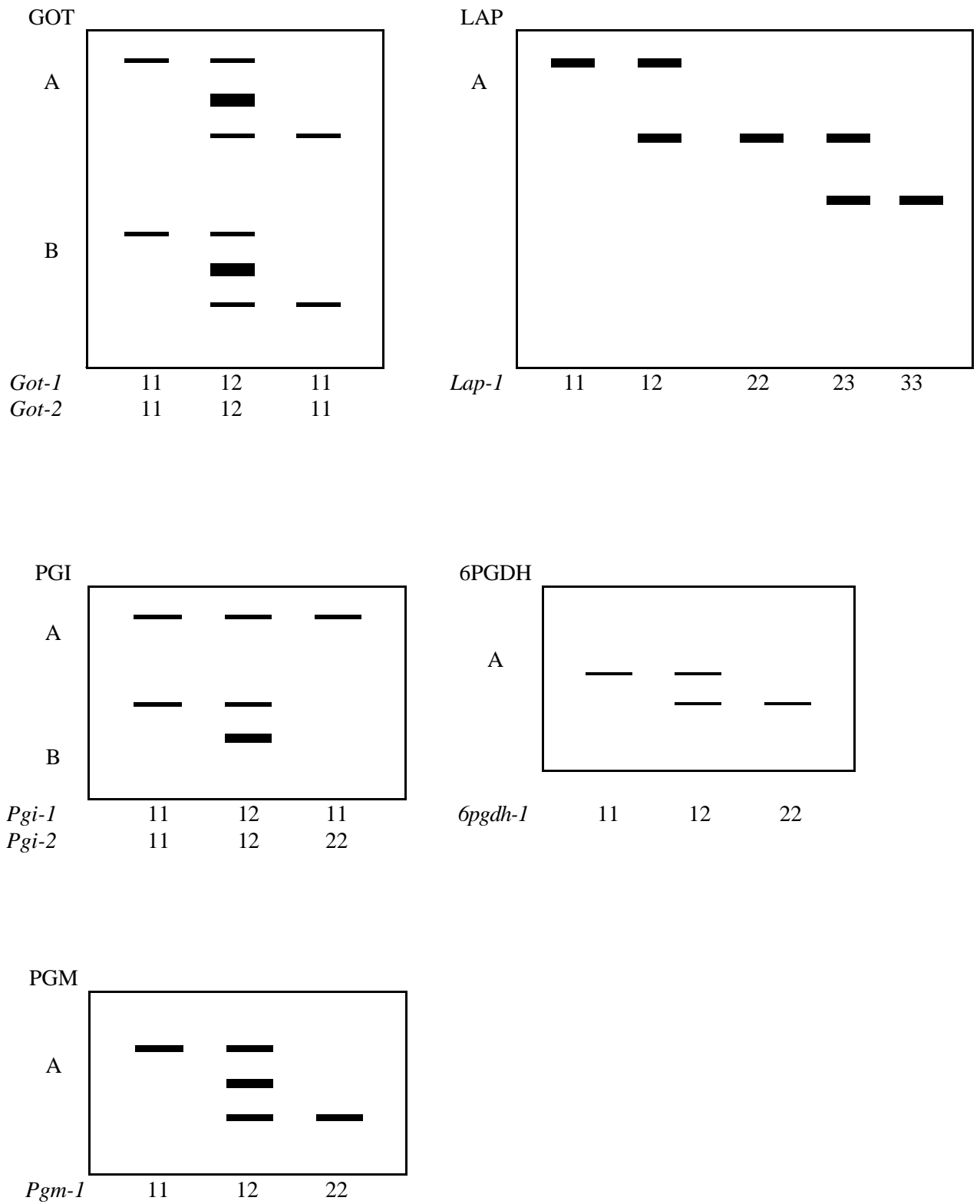


FIGURA 1 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *M. urundeuva* nos sistemas GOT, LAP, PGI, 6PGDH e PGM, juntamente com seus respectivos genótipos.

### 6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH)

O sistema 6PGDH apresentou uma zona de atividade (FIGURA 1). Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico (*6pgdh-1*), de expressão monomérica, segregando dois alelos cada. Um estudo em *Pinus massoniana* Lamb. (Huang *et al.*, 1994) também observou padrão fenotípico de indivíduos heterozigotos típico de enzimas monoméricas, embora muitos outros tenham observado este sistema como dimérico (El-Kassaby *et al.*, 1982; Müller-Starck & Liu, 1988; Perry & Knowles, 1989; Sousa *et al.*, 2002).

### Fosfogluco isomerase (PGI)

O sistema PGI apresentou duas zonas de atividades. A zona de migração mais rápida (*Pgi-1*) era monomórfica e, por isso, foi excluída da análise genética. A zona mais lenta (*Pgi-2*) era polimórfica e foi interpretada como um loco controlado por enzimas de expressão dimérica, segregando dois alelos (FIGURA 1).

### Fosfoglucomutase (PGM)

O sistema PGM apresentou duas zonas de atividade enzimática (FIGURA 1). A zona de migração mais anódica (*Pgm-1*) era polimórfica e segregou dois alelos. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos indica que esse loco é controlado por uma enzima dimérica. A segunda zona, mais catódica (*Pgm-2*), não apresentou padrão de resolução nas condições de eletroforese utilizada que permitisse sua correta interpretação.

## 3.2 Padrões de Segregação

Foram detectados indícios significativos de heterogeneidade no padrão de segregação entre progênies de árvores heterozigotas de mesmo genótipo nos locos *Got-1*, *Lap-1*, *Pgi-2* e *Pgm-1* (TABELA 2). Contudo, quando progênies revelando desvios significativos foram excluídas das análises, nenhum desses locos revelou heterogeneidade de segregação.

O teste de qui-quadrado agrupado revelou desvio da razão de segregação esperada 1:1 para o loco *Got-1*, mesmo quando progênies de árvores heterozigotas, apresentando desvios significativos, foram excluídas da análise. Isso indica que esse loco pode não estar sob controle genético ou pode estar ocorrendo seleção, distorção meiótica, interações interalélicas, erros de interpretações dos zimogramas, ou simplesmente o fenômeno ocorreu por acaso (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985). Outra causa poderia ser a ligação dos marcadores a alelos deletérios, o que poderia levar a desvios de segregação pela eliminação de alelos ligados a alelos deletérios (Strauss & Conkle, 1986). Vários estudos realizados com espécies arbóreas relatam desvios da razão de segregação (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985; Perry & Knowles, 1989; Morgante *et al.*, 1993; Sousa *et al.*, 2002). No sistema GOT, desvios de segregação têm sido observados no loco *Got-2*, como em *Araucaria angustifolia* (Mart.) O.K. (Sousa *et al.*, 2002) e *Cedrus atlantica* Manetti (Fallour *et al.*, 2001).

## 3.3 Desequilíbrio Gamético

Foram detectados poucos indícios de desequilíbrio de ligação nas progênies de *M. urundeuva* (TABELA 3). Das 15 possíveis combinações entre pares de locos, só foram detectados indícios significativos de desequilíbrio gamético entre o par *Lap-1:Pgi-2* ( $\hat{\Delta}_{ij} = 0,010$ ,  $\chi^2 = 3,98$ ,  $P = 0,046$ ). Nos demais pares de combinações entre locos não foram detectados indícios de ligação, e pode-se afirmar que os alelos de diferentes locos não estão associados e segregam independentemente. Em relação ao par de locos aparentemente ligado, *Lap-1:Pgi-2*, os resultados indicam que embora os alelos não segreguem independentemente, a ligação é fraca ( $\hat{\Delta}_{ij} = 0,010$ ) e, por isso, a manutenção desses locos deve ter pouca influência na estimativa de parâmetros genéticos, sem a exclusão de algum desses. O desequilíbrio de ligação entre os locos *Lap-1:Pgi-2* não é reportado em nenhum outro estudo com espécies arbóreas.

TABELA 2 – Teste para hipótese de segregação regular ( $\chi^2$ ) de marcadores isoenzimáticos em *M. urundeuva*.

Loco	Genótipo materno	Caso <sup>1</sup>	Número de árvores (n)	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$	$\sum \chi^2_{Heterogeneidade}$ GL = n-1	$\chi^2_{1:1 Agrupado}$ GL = 1	Árvores com desvios de segregação
<i>Got-1</i>	$A_1A_2$	a)	11	36:153	–	29,89**	72,43**	7
		b)	4	24:41	–	4,14	4,45*	
<i>Got-2</i>	$A_1A_2$	a)	12	85:103	–	9,26	1,72	
		a)	27	238:260	–	79,80**	0,97	8
<i>Lap-1</i>	$A_1A_2$	b)	19	186:173	–	12,59	0,47	
		a) <sup>2</sup>	2	21:19	0:0	2,50	0,10	
<i>6gpdh-1</i>	$A_1A_2$	a)	3	26:34	–	1,88	1,07	
		a) <sup>2</sup>	5	26:30	15:14	15,96	0,32	1
<i>Pgi-2</i>	$A_1A_2$	a)	27	218:256	–	43,32*	3,05	5
		b)	22	187:203	–	17,48	0,66	
<i>Pgm-1</i>	$A_1A_2$	a)	16	136:169	–	38,90**	3,57	4
		b)	12	119:106	–	10,85	0,56	

(1) a) inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco; b) exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(2) 2 x GL.

$N_{ij}$  e  $N_{ii} + N_{jj}$  são os números observados dos genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

$N_{ik}$  e  $N_{jk}$  são os números observados de genótipos heterozigotos do tipo  $ik$  e  $jk$ , respectivamente.

(\*)  $P < 0,05$ .

(\*\*)  $P < 0,01$ .

TABELA 3 – Valores da medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ), resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e probabilidade associada ( $P$ ) para pares de locos isoenzimáticos em *M. urundeuva*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$P$
<i>Got-1:Got-2</i>	0,000	0,09	0,770
<i>Got-1:Lap-1</i>	-0,008	1,96	0,161
<i>Got-1:Pgi-2</i>	0,002	0,20	0,654
<i>Got-1:6pgdh-1</i>	-0,000	0,00	0,969
<i>Got-1:Pgm-1</i>	0,003	0,34	0,562
<i>Got-2:Lap-1</i>	0,006	2,39	0,122
<i>Got-2:Pgi-2</i>	0,001	1,32	0,250
<i>Got-2:6pgdh-1</i>	0,004	0,02	0,881
<i>Got-2:Pgm-1</i>	0,004	0,58	0,447
<i>Lap-1:Pgi-2</i>	0,010	3,98*	0,046
<i>Lap-1:6pgdh-1</i>	-0,000	0,01	0,907
<i>Lap-1:Pgm-1</i>	-0,004	0,64	0,424
<i>Pgi-2:6pgdh-1</i>	-0,004	1,25	0,263
<i>Pgi-2:Pgm-1</i>	0,001	0,62	0,432
<i>6pgdh-1:Pgm-1</i>	0,001	0,14	0,708

(\*)  $P < 0,05$ .

#### 4 CONCLUSÕES

Em *M. urundeuva*, aparentemente, o loco isoenzimático *Got-1* não segrega na razão de segregação mendeliana 1:1.

Os pares de locos *Lap-1:Pgi-2* aparentemente não segregam de forma independente, estando possivelmente em equilíbrio gamético ou ligados.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo financiamento do projeto; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelas bolsas concedidas e aos técnicos: Ailton dos Reis, Alexandre Marques da Silva e Gelson Dias Fernandes, pela coleta do material de campo.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 71, p. 33-40, 1980.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 574 p.
- BROWN, A. H. D.; ALLARD, R. W. Estimation of mating system in open-pollinated maize populations using isozymes polymorphisms. **Genetics**, Washington, D.C., v. 66, p. 133-145, 1970.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.
- CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 34, p. 142-148, 1985.

EL-KASSABY, Y. A.; YEH, F. C.; SZIKLAI, O. Inheritance of allozyme variants in Coastal Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 24, p. 325-335, 1982.

FALLOUR, D.; FADY, B.; LEFÈVRE, F. Evidence of variation in segregation patterns within a *Cedrus* population. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 92, p. 260-266, 2001.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.

HUANG, Q. Q. *et al.* Genetic control of isozyme variation in Masson Pine, *Pinus massoniana* Lamb. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 285-292, 1994.

LACERDA, C. M. B. *et al.* Definição de protocolo enzimático para estudo da estrutura genética da aroeira. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 311-315, 2001.

MATHER, K. **The measurement of linkage in heredity**. New York: John Wiley & Sons, 1963. 149 p.

MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G. G.; GIANNINI, R. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Pinus leucodermis* Ant. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 231-236, 1993

MÜLLER-STARCK, G.; LIU, Y. Q. Genetics of *Cunninghamia lanceolata* Hook. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 236-243, 1988.

PERRY, D. J.; KNOWLES, P. Inheritance and linkage relationships of allozymes of eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) in northwestern Ontario. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 245-250, 1989.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Version 1.1. British Columbia: University of British Columbia. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>>. Acesso em: 18 abr. 1998.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, p. 191-196, 2002.

STRAUSS, S. H.; CONKLE, M. T. Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone pine. **Theoretical and Applied Genetics**, Asheville, v. 72, p. 483-493, 1986.

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

WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.

YEH, F. C.; YANG, R. **POPGENE ver. 1.32: population genetics analysis**. Alberta: University of Alberta, 1999.

# VARIAÇÃO GENÉTICA EM CINCO PROCEDÊNCIAS DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. NO SUL DO ESTADO DE SÃO PAULO\*

Alexandre Magno SEBBENN\*\*

Ananias de Almeida Saraiva PONTINHA\*\*\*

Sivaldo Alves de FREITAS\*\*\*

José Antonio de FREITAS\*\*\*

## RESUMO

Em dezembro de 1973 um teste de procedências de *Araucaria angustifolia* foi estabelecido na Estação Experimental de Itapeva, Estado de São Paulo, com cinco procedências, 64 indivíduos por parcela e seis repetições. Em 1981 o ensaio foi submetido a um desbaste sistemático de 50% das árvores. A distribuição da variação genética, entre e dentro de procedências para altura e DAP, foi investigada aos 2, 6 e 30 anos de idade, e para volume comercial aos 30 anos. As análises de variância revelaram diferenças altamente significativas entre procedências para todos os caracteres e idades de avaliação. Da variação fenotípica total, 5,45% a 15,18% foram encontradas entre procedências, sendo que o restante estava dentro das procedências. Aos 30 anos de idade, a procedência Campo do Jordão (SP) apresentou o melhor desempenho para todos os caracteres, e a Bom Jardim (SC) apresentou o pior. Foram observadas correlações negativas entre a performance das procedências e suas latitudes de origem, indicando que procedências de origem norte de distribuição da espécie crescem mais nas condições ambientais da Estação Experimental de Itapeva do que as de origem sul.

Palavras-chave: pinheiro do Paraná; teste de procedências; coníferas; espécies arbóreas tropicais.

## 1 INTRODUÇÃO

*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Araucariaceae) (pinheiro-do-paraná) já foi a principal espécie arbórea brasileira explorada comercialmente (Sousa, 2000). Essa conífera dióica polinizada pelo vento foi submetida à exploração ostensiva e desordenada durante o final do século XIX, até meados da década de 70, do século XX, o que a levou quase à extinção (Food and Agriculture Organization of the United

## ABSTRACT

In December, 1973 a provenance test of *Araucaria angustifolia* was established in Itapeva Experimental Station, São Paulo State, Brazil, with five provenances, 64 individuals per plot and 6 replicates. In 1981 the trial was submitted to systematic cutting from 50% of the trees. The distribution of the variation among and within provenances for height and DBH was investigated at 2, 6 and 30 years old, and the volume at 30 years old. Variation analysis for all traits and years of evaluations revealed significant genetic differences among provenances. From total phenotypic variation, 5.45% to 15.18% were finding among provenance. Provenance from Campos do Jordão (SP) was the best for grown among all traits and Bom Jardim (SC) was the worst. Negative correlation between performance of provenances and their origin latitudes were observed, indicating that north provenances of natural species distribution grow more in the environmental conditions of Itapeva Experimental Station than south provenances.

Key words: Paraná pine; provenance test; coniferous; tropical tree species.

Nations - FAO, 1972). Hoje, de sua ampla distribuição natural no Brasil, que ocorre entre as latitudes 19°15'S. (Conselheiro Pena-MG) a 31°39'S. (Canguçu-RS) e longitudes de 41°30'W. a 54°30'W. e em altitudes que variam de 500 m a 2.300 m, sobraram apenas pequenas manchas esparsas e isoladas (Carvalho, 1994). A espécie é exclusiva da Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucária), nas formações Aluvial (galeria), Submontana, Montana e Alto-Montana. Pode atingir 50 m de altura e 250 cm de DAP.

(\*) Aceito para publicação em setembro de 2004.

(\*\*) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

(\*\*\*) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil.

Embora seu crescimento inicial seja lento, a partir do terceiro ano, em sítios adequados apresenta incremento médio anual em altura de 1 m, e a partir do quinto ano, o incremento médio em DAP é de 1,5 a 2,0 cm. O incremento em volume pode atingir 30 m<sup>3</sup>/ha/ano. A madeira é de alta qualidade e de ampla utilidade e os pinhões (sementes) são fontes de alimento para homens e animais (Carvalho, 1994).

Os testes de procedências têm importante função na escolha de qual material genético é mais apropriado para o reflorestamento de uma determinada região. Contudo, existem muitos outros usos potenciais para testes de procedências maduros. Podem ser usados para propagação massal de material, fornecer material para melhoramento, como referência histórica e ajudar na conservação genética. Podem, também, ser usados para estudos da interação genótipo ambiente, zoneamento de limites adaptativos e ecológicos, padrões de variação genética e fluxo gênico, identificação de causas e origem da variação genética, taxonomia e histórico evolutivo, crescimento e produtividade, estudos das propriedades da madeira, correlações entre fase juvenil e madura, mapeamento ambiental, mudanças ambientais, efeitos da domesticação e mudanças evolutivas correntes, efeitos da introdução, efeitos fisiológicos, resposta para mudanças ambientais, predição das conseqüências de mudanças ambientais e interação com outras espécies (Lindgren, 1997). Dentro desse contexto, estudos conduzidos com procedências de *A. angustifolia* vêm, há muito tempo, revelando a existência de variação genética entre diferentes origens geográficas e alto potencial genético para o melhoramento e a conservação genética (Gurgel & Gurgel Filho, 1965, 1973; Baldanzi *et al.*, 1973; Kageyama & Jacob, 1980; Shimizu & Higa, 1980; Giannotti *et al.*, 1982; Shimizu, 1999; Sebbenn *et al.*, 2003).

O presente trabalho investiga o comportamento genético e silvicultural de cinco procedências de *A. angustifolia*, aos 2, 6 e 30 anos de idade, nas condições ambientais de Itapeva, Estado de São Paulo. O objetivo foi investigar a distribuição da variação genética, entre e dentro de cinco procedências de *A. angustifolia*, com intuito de sua conservação e melhoramento genético.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem e Delineamento Experimental

Em 1973, sementes de polinização aberta foram coletadas em cinco procedências de *A. angustifolia* em três estados brasileiros (TABELA 1). As sementes foram germinadas e, em 1973/1974 (dezembro/janeiro), suas mudas foram plantadas em forma de teste de procedências na Estação Experimental de Itapeva, SP (E.E. de Itapeva). O ensaio obedeceu ao delineamento experimental de blocos ao acaso, com cinco tratamentos (procedências), seis repetições, parcelas quadradas de 64 árvores, todas úteis, espaçamento 3 x 3 m e bordadura externa de duas linhas. Em 1981, o ensaio foi submetido a um desbaste sistemático com a retirada de aproximadamente 50% das árvores inicialmente implantadas.

Dados de altura foram medidos aos 2 (ALT2), 6 (ALT6) e 30 (ALT30) anos de idade, e dados de DAP aos 6 (DAP6) e 30 anos (DAP30). Também foi estimado o volume individual sem casca (VSC) aos 30 anos de idade (VOL30), usando-se a expressão proposta por Machado *apud* Shimizu (1999):

$$VSC = 0,01765474 + 0,3966295d^2h.$$

TABELA 1 – Coordenadas geográficas, altitude e características do local de experimentação e origens das procedências.

Local	Latitude S	Longitude N	Altitude (m)	Precipitação (mm)	Temp. média (°C)
Ensaio Itapeva, SP	24°02'	49°06'	730	1.247	14,0
Monte Alegre, SP	22°12'	50°32'	760	1.318	19,1
Campos do Jordão, SP	22°44'	45°34'	1.630	1.891	14,5
Campo Mourão, PR	24°03'	52°22'	617	1.321	19,8
Bom Jardim, SC	28°18'	49°32'	800	1.600	13,1
Lauro Müller, SC	28°30'	49°24'	198	1.377	19,0

## 2.2 Análise Estatística

A análise da variância, para cada caráter, foi realizada em nível de plantas individuais. Como o experimento era desbalanceado, devido ao número desigual de árvores sobreviventes por parcelas e ao desbaste realizado, utilizou-se o método REML (Restricted Maximun Likelihood) combinado com o procedimento VARCOMP, implementados no programa estatístico SAS (SAS, 1999), para as estimativas dos componentes da variância. A análise de variância, para cada caráter, foi realizada com base no seguinte modelo linear,

$$Y_{ijk} = m + b_i + t_j + e_{ij} + d_{ijk}$$

em que,  $Y_{ijk}$  é o valor fenotípico do  $k$ -ésimo indivíduo da  $j$ -ésima procedência da  $i$ -ésimo bloco;  $m$  é o termo fixo da média total;  $b_i$  é o efeito aleatório do  $i$ -ésimo bloco;  $t_j$  é o efeito aleatório da  $j$ -ésima procedência;  $e_{ij}$  é o efeito aleatório da interação entre a  $j$ -ésima procedência e o  $i$ -ésimo bloco (erro entre);  $d_{ijk}$  é o efeito do erro dentro de procedência; sendo:  $i = 1 \dots b$  ( $b$  é o número de blocos);  $j = 1 \dots t$  ( $t$  é o número de procedência);  $k = 1 \dots n$  ( $n$  é o número de árvores por procedência). Com exceção da média, todos os demais efeitos foram assumidos como aleatórios. O esquema da análise de variância encontra-se na TABELA 2. A variância fenotípica dentro de procedências ( $\hat{\sigma}_d^2$ ) foi estimada pela média ponderada dos quadrados médios entre plantas dentro das parcelas.

Assim, os componentes de variância estimados foram:  $\hat{\sigma}_p^2$  = variância genética entre procedências;  $\hat{\sigma}_e^2$  = variância ambiental;  $\hat{\sigma}_d^2$  = variância fenotípica dentro de procedências. Dos componentes de variância estimou-se a divergência genética entre procedências ( $\hat{Q}_{ST}$ ) por,

$$\hat{Q}_{ST} = \frac{\hat{\sigma}_p^2}{\hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_e^2 + \hat{\sigma}_p^2}.$$

As correlações genéticas ( $\hat{r}_g$ ) entre os caracteres e idades de avaliação foram estimadas em nível de plantas individuais usando a equação:

$$\hat{r}_g = \frac{\hat{\sigma}_{p_x p_y}}{\sqrt{\hat{\sigma}_{p_x}^2 \hat{\sigma}_{p_y}^2}},$$

sendo,  $\hat{\sigma}_{g_x g_y}$  o produtório genético cruzado dos caracteres  $x$  e  $y$ ;  $\hat{\sigma}_{p_x}^2$  e  $\hat{\sigma}_{p_y}^2$  são as variâncias genéticas entre procedências dos caracteres  $x$  e  $y$ , respectivamente. Os produtórios cruzados foram estimados da análise de covariância. A associação entre caracteres e características dos locais de origem das procedências foi estimada pelo coeficiente de correlação linear de Sperman ( $\hat{r}$ ), calculado utilizando-se o procedimento PROC REG implementado no programa SAS (SAS, 1999).

TABELA 2 – Quadro da análise de variância para cada caráter em nível de plantas individuais.

Fonte de variação	GL	QM	E(QM)
Blocos	I-1	QM <sub>1</sub>	–
Procedências	J-1	QM <sub>2</sub>	$\sigma_d^2 + \bar{K}\sigma_e^2 + I\bar{K}\sigma_p^2$
Resíduo	(J-1)(I-1)	QM <sub>3</sub>	$\sigma_d^2 + \bar{K}\sigma_e^2$
Dentro de procedências	JI( $\bar{K}$ - 1)	QM <sub>4</sub>	$\sigma_d^2$
Total	JI $\bar{K}$ - 1	–	–

Em que:  $J$  = número de blocos;  $I$  = número de procedências, e  $\bar{K}$  = média harmônica do número de plantas por parcela.

A resposta esperada com a seleção massal no ensaio ( $\hat{R}$ ) foi estimada por  $\hat{R} = i\hat{\sigma}_F\hat{h}_i^2$ , em que,  $i$  é a intensidade de seleção em unidade de desvio padrão,  $\hat{\sigma}_F$  é o desvio padrão da variância fenotípica total ( $\hat{\sigma}_F^2 = \hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_e^2 + \hat{\sigma}_p^2$ ) e  $\hat{h}_i^2$  é o coeficiente de herdabilidade em nível de plantas individuais. Como se tratava de teste de procedências e, portanto, não é possível estimar herdabilidades, estas foram inferidas do trabalho de Sebbenn *et al.* (2003), que estudou a herança dos mesmos caracteres aqui avaliados, aos 18 anos de idade, em teste de procedências e progênies implantado no mesmo local do presente ensaio. Estimou-se os ganhos esperados com a seleção massal de 40% ( $i = 0,9659$ , Hallauer & Miranda Filho, 1988) das melhores árvores no ensaio aos 30 anos de idade. A resposta à seleção em porcentagem [ $\hat{R}$  (%)] foi calculada por:

$$\hat{R}(\%) = \frac{\hat{R}}{\bar{x}} \times 100,$$

em que,  $\bar{x}$  é a média do caráter no ensaio.

TABELA 3 – Estimativas de quadrados médios, resultados do teste F, coeficiente de variação experimental ( $CV_{exp}$ ) e componentes da variância para altura, DAP e volume de *A. angustifolia* em Itapeva.

Parâmetro	ALT2	ALT6	ALT30	DAP6	DAP30	VOL30
QM <sub>Proc.</sub>	10,9195**	33,4150**	488,1392**	602,0552**	610,8339**	1,3460**
QM <sub>Erro</sub>	1,1830	5,560	59,0704	124,4934	91,4272	0,1909
CV <sub>exp</sub>	25,63%	14,61%	21,82%	50,77%	29,39%	72,40%
$\hat{\sigma}_p^2$	0,0258	0,0752	3,0649	1,3053	3,6811	0,0082
$\hat{\sigma}_e^2$	0,0120	0,0766	1,4759	1,5846	1,5926	0,0030
$\hat{\sigma}_d^2$	0,4356	0,8267	15,6498	25,5610	36,2428	0,0783
$\hat{Q}_{ST}$	0,0545	0,0769	0,1518	0,0459	0,0887	0,0916

(\*\*)  $P < 0,01$ .

$$\hat{Q}_{ST} = \hat{\sigma}_p^2 / (\hat{\sigma}_p^2 + \hat{\sigma}_e^2 + \hat{\sigma}_d^2).$$

### 3.2 Taxa de Crescimento

A classificação de crescimento de algumas procedências alterou-se com o desenvolvimento das árvores (TABELA 4). Por exemplo, a procedência Campos do Jordão (SP) apresentou o pior desempenho aos 2 anos de idade, foi a quarta na classificação aos 6 anos e a primeira aos 30 anos.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Variação Entre Procedências

As análises de variância (TABELA 3) detectaram diferenças altamente significativas (1% de probabilidade) entre as procedências de *A. angustifolia* para todos os caracteres, em todas as idades avaliadas, indicando diferenças genéticas entre procedências e potencial, tanto para o melhoramento como para a conservação genética. Diferenças significativas entre procedências de *A. angustifolia*, para caracteres quantitativos, também têm sido reportadas em diversos outros estudos (Gurgel & Gurgel Filho, 1965; Baldanzi *et al.*, 1973; Fahler & Lucca, 1980; Shimizu & Higa, 1980; Kageyama & Jacob, 1980; Monteiro & Speltz, 1980; Giannotti *et al.*, 1982; Shimizu, 1999; Sebbenn *et al.*, 2003). Essas diferenças têm sido interpretadas como indicativas da existência de raças geográficas na espécie (Gurgel & Gurgel Filho, 1965) e indicam que progressos genéticos podem ser alcançados com a seleção das procedências mais adaptadas para cada região ou local de plantio. Diferenças significativas entre populações naturais de *A. angustifolia* também têm sido relatadas em estudos baseados em dados de marcadores genéticos (Sousa, 2000; Auler *et al.*, 2002).

A procedência Campo Mourão (PR) era a procedência de melhor desempenho aos 2 e 6 anos de idade e tornou-se a quarta na classificação aos 30 anos. Por outro lado, a procedência Bom Jardim teve o pior desempenho em todos os caracteres e anos de avaliação, com exceção do caráter altura aos dois anos de experimentação (ALT2).

TABELA 4 – Estimativas de médias ( $\pm IC_{95\%}$ ) e incremento médio anual (IMA) para altura (ALT), DAP e volume comercial sem casca em cinco procedências de *A. angustifolia*, em Itapeva.

	ALT2 (m)	ALT6 (m)	ALT30 (m)	DAP6 (cm)	DAP30 (cm)	VOL30 (m <sup>3</sup> /ind.)
Proc. MA	2,58 $\pm$ 0,06b	6,30 $\pm$ 0,12c	18,35 $\pm$ 0,66b	8,10 $\pm$ 0,12e	20,90 $\pm$ 1,04c	0,3955 $\pm$ 0,0464c
Proc. CJ	2,25 $\pm$ 0,04d	6,18 $\pm$ 0,10d	19,61 $\pm$ 0,66a	11,46 $\pm$ 0,66a	22,18 $\pm$ 1,00a	0,4695 $\pm$ 0,0476a
Proc. CM	2,64 $\pm$ 0,12a	6,50 $\pm$ 0,08a	19,15 $\pm$ 0,68b	10,77 $\pm$ 0,56b	21,72 $\pm$ 1,06b	0,4453 $\pm$ 0,0536b
Proc. BJ	2,34 $\pm$ 0,04c	5,73 $\pm$ 0,08e	14,90 $\pm$ 0,72e	9,59 $\pm$ 0,44d	17,04 $\pm$ 1,04e	0,2234 $\pm$ 0,0486e
Proc. LM	2,58 $\pm$ 0,04b	6,41 $\pm$ 0,10b	18,15 $\pm$ 0,61d	9,74 $\pm$ 0,52c	20,07 $\pm$ 0,82d	0,3744 $\pm$ 0,0272d
Média	2,48	6,22	18,12	9,96	20,47	0,3864
IMA	1,24	1,24	0,60	1,99	0,68	0,0129

$IC_{95\%}$  é o intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade,  $IC_{95\%} = 1,96 * (\hat{\sigma} / \sqrt{n})$ , sendo  $\hat{\sigma}$  o desvio padrão fenotípico e  $n$  o tamanho da amostra.

As três procedências de origem mais próxima (Campos do Jordão, Campo Mourão e Monte Alegre) ao local de experimentação (Itapeva) apresentaram melhor desempenho aos 30 anos de idade, em comparação às duas procedências mais distantes (Bom Jardim e Lauro Müller). Aos 30 anos de idade a procedência Campos do Jordão (SP) superou as demais em todos os caracteres, embora as diferenças em relação às procedências Campo Mourão (PR) e Monte Alegre (SP) não sejam significativas para nenhum dos caracteres, a julgar pelo intervalo de confiança do erro da média a 95% de probabilidade (1,96 x Erro padrão). Em relação às duas outras procedências (Bom Jardim e Lauro Müller), as diferenças foram significativas. As procedências Campo Mourão (PR) e Monte Alegre (SP) não diferiram significativamente da procedência Lauro Müller, mas ambas diferiram em relação à procedência Bom Jardim (SC). A procedência Lauro Müller também diferiu significativamente da procedência Bom Jardim. Esses resultados claramente demonstram o forte efeito das procedências em relação ao crescimento das árvores, que a escolha da procedência pode ter grande influência no aumento da produtividade no presente local de experimentação, e que, aparentemente, as procedências amostradas do Estado de Santa Catarina não são as mais adequadas para reflorestamentos nas condições ambientais de Itapeva (TABELA 1). Desempenho inferior da procedência Bom Jardim, nas condições ambientais de Itapeva, também é reportado por Sebbenn *et al.* (2003) comparando cinco procedências de *A. angustifolia*, aos 18 anos de idade, para os mesmos caracteres aqui avaliados.

Os autores observaram que a procedência Bom Jardim teve o pior crescimento em relação às demais, embora uma outra procedência do Estado de Santa Catarina (São Joaquim) tenha assumido o terceiro lugar na classificação das melhores em crescimento em altura e volume.

Comparando o volume da procedência de melhor performance (0,4695 m<sup>3</sup>/indivíduo, Campos do Jordão) com a de pior performance (0,2234 m<sup>3</sup>/indivíduo, Bom Jardim), verifica-se que a de melhor desempenho cresceu, aproximadamente, 52% a mais do que a de pior performance. Isso evidencia e reforça a hipótese de que existem possibilidades de se obter ganhos genéticos com a seleção da melhor procedência. Adicionalmente, outros ganhos poderão ser obtidos com a seleção dos melhores genótipos dentro da melhor procedência (seleção massal).

Os incrementos médios anuais para altura (1,24 m) e DAP (1,99 cm), observados aos dois e seis anos de idade, encontram-se dentro da amplitude relatada para a espécie em sítios adequados (1 m para altura e 1,5 cm a 2,0 cm para o DAP) (Carvalho, 1994). Contudo, o incremento médio anual medido aos 30 anos foi de 0,6 m para altura e 0,68 cm para DAP, valores estes muito inferiores aos relatados por Carvalho (1994). O incremento médio anual para volume comercial sem casca, aos 30 anos de idade, foi de 0,0129 m<sup>3</sup>/ano, o que representa ao crescimento média anual em volume de 5,16 m<sup>3</sup>/ha/ano, considerando uma densidade de 400 árvores por hectare e populações sem nenhum grau de melhoramento genético.

### 3.3 Variação Genética Entre e Dentro de Procedências

Os resultados da distribuição da variação genética, entre e dentro de procedências (TABELA 3), demonstraram que uma considerável parte da variação se encontra entre procedências ( $\hat{Q}_{ST}$ ), embora a maior parte se encontre dentro de procedências ( $\hat{Q}_D = 1 - \hat{Q}_{ST}$ ). A estimativa da divergência genética entre procedências ( $\hat{Q}_{ST}$ ) variou de 0,0545 (ALT2) a 0,1518 (ALT30) entre os caracteres avaliados. Observando o padrão de variação dos valores do coeficiente  $\hat{Q}_{ST}$ , entre idades para altura e DAP, verifica-se a tendência de aumento com o crescimento das árvores. Isso significa que, com a maturação das árvores as diferenças genéticas entre as procedências aumentaram. Contudo, o estudo de Sebbenn *et al.* (2003), comparando cinco procedências de *A. angustifolia*, detectou resultado oposto para o caráter altura. A divergência genética variou de 0,288, a um ano de idade, a 0,065 aos 18 anos de idade.

Os valores relatados na literatura para a medida de divergência genética entre procedências para caracteres quantitativos ( $\hat{Q}_{ST}$ ) em *A. angustifolia* têm variado de baixos (até 5%) a moderados (até 15%). Shimizu (1999) detectou divergência genética entre 18 procedências de *A. angustifolia*, aos 23 anos de idade, crescendo em Ribeirão Branco, SP, variando de 0,045 (volume comercial sem casca) a 0,073 (altura). Sebbenn *et al.* (2003) relatam divergência genética entre cinco procedências da espécie, aos 18 anos de idade, variando de 0,045 (volume comercial sem casca) a 0,065 (altura). Esse padrão observado de maior variação dentro de procedências em relação à entre procedências está de acordo com o esperado em espécies polinizadas pelo vento, de vida longa e reprodução predominante por cruzamentos (Hamrick, 1983), como no caso de *A. angustifolia*. Ainda, estudos da distribuição da diversidade genética, entre e dentro de populações naturais de *A. angustifolia*, com base em isoenzimas, têm, geralmente, detectado menores níveis de divergência genética entre populações ( $F_{ST}$ ) do que os observados com base em caracteres quantitativos. Auler *et al.* (2002), estudando nove populações de *A. angustifolia* do

Estado de Santa Catarina, observaram divergência genética entre populações de 0,044. Sousa (2000) detectou divergência genética entre populações de Campos do Jordão (SP), Irati (PR) e Caçador (SC) de 0,098. Marcadores isoenzimáticos são, geralmente, neutros e, portanto, não são afetados pela seleção natural, de forma que a divergência genética detectada entre populações ou procedências possa ser interpretada em termos de deriva genética e migração. Por outro lado, caracteres quantitativos como altura, DAP e volume são considerados caracteres indicativos de vigor e adaptabilidade e são fortemente afetados pela seleção natural, de forma que a diferenciação genética entre populações possa ser interpretada em termos de seleção natural, deriva genética e migração. Quando estimativas da divergência genética entre populações são obtidas para caracteres quantitativos e marcadores neutros, como isoenzimas, diversas hipóteses sobre as causas das diferenças genéticas entre populações podem ser testadas. Se as estimativas de  $F_{ST}$  são iguais a  $Q_{ST}$ , sugerem que a seleção natural tem pouca influência sobre a diferenciação entre populações para caracteres quantitativos. Se a estimativa de  $F_{ST}$  é maior do que  $Q_{ST}$ , então a seleção estabilizadora, para o mesmo fenótipo em diferentes populações, está provavelmente limitando a diferenciação entre populações. Se  $F_{ST}$  é menor do que  $Q_{ST}$ , então a seleção para alternativos fenótipos está provavelmente contribuindo para a diferenciação das populações (Howe *et al.*, 2003). Assim, comparando as estimativas de  $Q_{ST}$  aqui obtidas aos 30 anos de idade (TABELA 3) com as descritas por Sousa (2000) para populações procedentes dos mesmos Estados, pode-se supor que a diferenciação entre populações de *A. angustifolia*, para o caráter altura, esteja sob o efeito da seleção natural, para o caráter volume sob o efeito da deriva genética, e para o DAP sob o efeito da seleção estabilizadora. Contudo, esta abordagem é apenas especulativa, e uma resposta mais precisa sobre a origem da diferenciação entre populações de *A. angustifolia* só poderá ser obtida se ambas as estimativas da divergência genética neutra ( $F_{ST}$ ) e quantitativa ( $Q_{ST}$ ) forem calculadas simultaneamente para as mesmas populações.

### 3.4 Correlações Entre Caracteres e Características Geográficas e Climáticas das Procedências

A estimativa do coeficiente de correlação linear de Sperman ( $\hat{r}$ ) entre os caracteres medidos aos 30 anos de idade e as características geográficas e climáticas dos locais de origem das procedências (TABELA 5) detectaram valores negativos e significativos a 90% de probabilidade apenas entre os caracteres e a latitude de origem das sementes (variação de -0,71 a -0,87), indicando que essa característica geográfica pode estar influenciando o desempenho fenotípico das procedências.

Assim, procedências de menores latitudes (Campos do Jordão) poderiam apresentar melhor desempenho em termos de crescimento do que procedências de maior latitude (Bom Jardim e Lauro Müller). Resultados semelhantes são relatados em outro estudo do comportamento genético de procedências de *A. angustifolia* em Itapeva (Sebbenn *et al.*, 2003), onde foram observadas correlações negativas entre latitude e os caracteres altura (-0,86), DAP (-0,67) e volume (-0,58). Isso reforça a hipótese de que em Itapeva as procedências de origem norte da distribuição natural da espécie são, aparentemente, as mais indicadas para o reflorestamento.

TABELA 5 – Estimativas do coeficiente de correlação de Sperman ( $\hat{r}$ ) entre caracteres e características geográficas e climáticas das origens das procedências de *A. angustifolia*.

Características	ALT30	DAP30	VOL30
Latitude	-0,71a	-0,77a	-0,72a
Longitude	0,66	0,64	0,62
Altitude	0,26	0,33	0,39
Precipitação	-0,00	0,04	0,18
Temperatura média	0,56	0,51	0,50

(a)  $P < 0,1$ .

### 3.5 Correlações Genéticas Entre Caracteres

As estimativas do coeficiente de correlação genética, entre os caracteres em diferentes idades, detectaram algumas associações positivas e significativas, sugerindo a possibilidade de sucessos com a seleção precoce (TABELA 6). As correlações entre altura das árvores medidas aos 2 e 6 anos (0,71) e entre os 6 e 30 anos (0,83) e a correlação entre DAP medido aos 6 e 30 anos de idade (0,40) foram positivas e significativas a 99% de probabilidade. Portanto, existe a possibilidade de que parte dos genótipos, que seriam selecionados para altura e DAP aos seis anos de idade, sejam os mesmos que seriam selecionados aos 30 anos de idade, e vice-verso.

Contudo, a seleção não deve preceder a metade do ciclo de rotação da cultura (Zobel & Talbert, 1984), o que em *A. angustifolia* significa que a seleção não deve ser feita antes dos 8 ou 10 anos de idade (Sebbenn *et al.*, 2003).

As correlações entre os diferentes caracteres medidos aos 30 anos de idade (TABELA 6) foram ainda maiores que as observadas entre os mesmos caracteres em diferentes idades, com valores variando de 0,97 (ALT30 vs. VOL30 e DAP30 vs. VOL30) a 0,99 (ALT30 vs. VOL30), indicando que é possível a seleção direta em um caráter e a capitalização de ganhos indiretos em outros. Resultados semelhantes obtidos em procedências de *A. angustifolia* são reportados por Shimizu (1999) e Sebbenn *et al.* (2003).

TABELA 6 – Estimativas de correlações genéticas ( $\hat{r}_g$ ) entre idades e caracteres em cinco procedências de *A. angustifolia*.

	ALT6	ALT30	DAP6	DAP30	VOL30
ALT2	0,71**	0,24ns	–	–	–
ALT6		0,83**	0,10ns	–	–
ALT30			–	0,99**	0,97**
DAP6			–	0,40**	–
DAP30			–		0,97**

(\*)  $P \leq 0,01$ .

### 3.6 Progressos Genéticos

Com o intuito de conhecer o potencial do presente material genético para a produção de sementes melhoradas, foram simulados os ganhos esperados com a seleção massal de 40% das melhores árvores no ensaio, aos 30 anos de idade (TABELA 7). Contudo, tendo em vista que o presente teste não permitia a estimativa de coeficientes de herdabilidade, por tratar-se de teste de procedências, foram utilizados os valores de herdabilidade em nível de

plantas individuais (TABELA 7), reportados por Sebbenn *et al.* (2003) para a mesma espécie, no mesmo local de ensaio (E. E. de Itapeva) e para os mesmos caracteres (altura, DAP e volume comercial sem casca), aos 18 anos de idade. Com base nessas herdabilidades, conclui-se que os ganhos esperados em florestas com 30 anos de idade, plantadas a partir de sementes coletadas no presente teste, após a seleção, poderiam atingir entre 4,57% de ganho genético para altura, a 18,55% para o volume comercial sem casca.

TABELA 7 – Estimativa de ganhos esperados com a seleção de 40% das melhores árvores para os caracteres altura (ALT30), DAP (DAP30) e volume (VOL30), aos 30 anos de idade, em procedências de *A. angustifolia*.

Parâmetros	ALT30	DAP30	VOL30
Herdabilidade em nível de plantas – $\hat{h}_i^2$ *	0,402	0,376	0,248
Resposta esperada pela seleção massal – $\hat{R}$	4,57%	11,43%	18,55%

(\*) Fonte: Sebbenn *et al.* (2003).

## 4 CONCLUSÕES

- Existem diferenças altamente significativas entre procedências e, o presente teste, embora constituído por apenas cinco procedências, tem potencial tanto para o melhoramento como para a conservação genética de *A. angustifolia*.
- A maior parte da variação genética encontra-se distribuída dentro das procedências.
- A correlação fenotípica entre os caracteres de crescimento altura, DAP e volume comercial sem casca encontram-se altamente correlacionados, de forma que é possível se obter progressos genéticos indiretos em um caráter com a seleção direta em outro.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos aos Agentes de Apoio à Pesquisa Antonio Carlos de Freitas, Carlos Bagdal e Valdecir Benedito Ferreira, pela mensuração do ensaio, e aos dois revisores anônimos pelas correções e sugestões feitas no prévio manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AULER, N. M. F. *et al.* The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 239-338, 2002.
- BALDANZI, G.; RITTERSHOFER, F. O.; REISSMAN, C. B. Ensaio comparativo de procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 2., 1973, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Federação das Indústrias do Estado do Paraná - FIEP, 1973. 2º Com., trab. 23.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira.** Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.
- FAHLER, J. C.; LUCCA, C. M. DI. Variación geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.: informe preliminar a los 5 años. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1979, Curitiba. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná - FUPEF, 1980. p. 96-101.

SEBBENN, A. M. *et al.* Variação genética em cinco procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no sul do Estado de São Paulo.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Report of the second session of the FAO panel of experts on forest gene resources.** Roma: Forest Genetic Resources, 1972. 68 p.

GIANNOTTI, E. *et al.* Variação genética entre procedências e progênies de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., 1982, Belo Horizonte. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura - SBS, 1982. p. 970-975. (Silvicultura, São Paulo, n. 28, 1982).

GURGEL, J. T. A.; GURGEL FILHO, O. do A. Evidências de raças geográficas no pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 33-39, 1965.

\_\_\_\_\_. Caracterização de ecótipos, para o pinheiro brasileiro, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvic. S. Paulo**, São Paulo, v. 8, p. 127-132, 1973.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding.** Ames: State University Press, 1988. 468 p.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M. *et al.* **Genetics and conservation.** Menlo Park: Benjamin Cummings Publishing Company, 1983. p. 335-348.

KAGEYAMA, P. Y.; JACOB, W. S. Variação genética entre e dentro de populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1979, Curitiba. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná - FUPEF, 1980. p. 83-86.

LINDGREN, D. Vitalization of results from provenance tests. In: MTYS, C. (Ed.). **Perspective of forest genetics and tree breeding in a changing world.** Vienna: International Union of Forest Research Organization - IUFRO, 1997. p. 73-85. (IUFRO World Series, v. 6).

MONTEIRO, R. F. R.; SPELTZ, R. M. Ensaio de 24 procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1979, Curitiba. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná - FUPEF, 1980. p. 181-200.

HOWE, G. T. *et al.* From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, p. 1247-1266, 2003.

S.A.S. INSTITUTE INC. **SAS procedures guide.** Version 8 (TSMO). Cary, 1999. 454 p.

SEBBENN, A. M. *et al.* Variação genética entre e dentro de procedências de *Araucaria angustifolia* no sul do Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 109-124, 2003.

SHIMIZU, J. Y. Variação entre procedências de Araucária em Ribeirão Branco (SP) aos vinte e três anos de idade. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 38, p. 89-102, 1999.

\_\_\_\_\_.; HIGA, A. R. Variação genética entre procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. na região de Itapeva-SP, estimada até o 6<sup>o</sup> ano de idade. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1979, Curitiba. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná - FUPEF, 1980. p. 78-82.

SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** 2000. 161 f. Thesis (PhD) - Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University of Göttingen.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement.** North Carolina: North Carolina State University, 1984. 496 p.

# HERANÇA E LIGAÇÃO EM LOCOS ISOENZIMÁTICOS DE *Caesalpinia echinata* L. (PAU-BRASIL)<sup>1</sup>

João Del GIUDICE-NETO<sup>2</sup>  
Alexandre Magno SEBBENN<sup>3</sup>  
Paulo Yoshio KAGEYAMA<sup>4</sup>

## RESUMO

Este artigo apresenta o estudo da variação isoenzimática em *Caesalpinia echinata* L. (pau-brasil). Onze sistemas enzimáticos (ACP, DIA, EST, G6PDH, GOT, LAP, MDH, PGI, PRX, SKDH e 6PGDH) codificando dezoito locos (*Acp-1*, *Est-3*, *Dia-1*, *G6pdh-1*, *Got-1*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Prx-1*, *Prx-2*, *Prx-3*, *Prx-4*, *Skdh-1*, *6pgdh-1* e *6pgdh-2*) foram investigados. Entre esses locos, *Pgi-1* e *Got-1* foram detectados como monomórficos. Três locos (*Mdh-2*, *G6pdh-1* e *6pgdh-1*) não tiveram sua herança analisada devido à ausência de progênes de árvores heterozigotas na amostra. A herança mendeliana simples foi confirmada para dez locos (*Acp-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1* e *6pgdh-2*). Três locos (*Pgi-2*, *Prx-2* e *Prx-4*) apresentaram desvios altamente significativos ( $P < 0,01$ ) para a hipótese de segregação regular 1:1. As relações de desequilíbrios de ligações foram avaliadas em 120 pares de locos isoenzimáticos. Seis pares de locos apresentaram ligação: *Mdh-3:Dia-1*, *Mdh-3:Prx-3*, *6pgdh-1:Pgi-2*, *6pgdh-1:Prx-1*, *6pgdh-2:Prx-3* e *Pgi-2:Prx-4*.

Palavras-chave: segregação; *Caesalpinia echinata*; espécies arbóreas tropicais.

## 1 INTRODUÇÃO

*Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae) é uma espécie arbórea endêmica brasileira típica da floresta ombrófila densa. Sua ocorrência natural vai do Estado do Rio Grande do Norte (05°45'S) ao Rio de Janeiro (23°S) (Carvalho, 1994). *C. echinata* foi a primeira espécie arbórea brasileira a ser explorada comercialmente em larga escala. Sua exploração teve grande importância econômica para o país no início da colonização,

## ABSTRACT

This article presents a study of isozyme variation in *Caesalpinia echinata* L. (brazilwood). Eleven isozyme systems (ACP, DIA, EST, G6PDH, GOT, LAP, MDH, PGI, PRX, SKDH and 6PGDH) codifying eighteen loci (*Acp-1*, *Est-3*, *Dia-1*, *G6pdh-1*, *Got-1*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Prx-1*, *Prx-2*, *Prx-3*, *Prx-4*, *Skdh-1*, *6pgdh-1* and *6pgdh-2*) were investigated. Among these loci, *Pgi-1* and *Got-1* were monomorphic. Three loci (*Mdh-2*, *G6pdh-1* and *6pgdh-1*) were not evaluated for inheritance due the lack of families from heterozygous mother trees in the sampling. Mendelian inheritance was confirmed for ten allozyme loci (*Acp-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1*, and *6pgdh-2*). Three loci (*Pgi-2*, *Prx-2* and *Prx-4*) showed significant deviations ( $P < 0.01$ ) from expected segregation 1:1 hypothesis. Linkage relationships were examined for 120 pairs of allozyme loci. Six pairs of loci showed linked: *Mdh-3:Dia-1*, *Mdh-3:Prx-3*, *6pgdh-1:Pgi-2*, *6pgdh-1:Prx-1*, *6pgdh-2:Prx-3* and *Pgi-2:Prx-4*.

Key words: segregation; *Caesalpinia echinata*; tropical tree species.

especialmente pela presença de corantes em sua madeira, que eram usados para a fabricação de tintura para roupas. No entanto, sua intensiva e desordenada exploração, iniciada logo após a ocupação da costa brasileira pelos colonizadores portugueses, reduziu sua distribuição a pequenos remanescentes na atualidade (Mello-Filho, 1991/1992; Cardoso *et al.*, 1998), levando a espécie para a lista das arbóreas em alto risco de extinção (Brasil, 1992). Hoje, há apenas pequenas populações remanescentes isoladas e, portanto, medidas para a sua conservação devem ser adotadas imediatamente.

(1) Aceito para a publicação em setembro de 2004.

(2) Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: jdjudic@ig.com.br

(3) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

(4) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 15, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

A conservação genética de uma espécie requer o conhecimento de seu sistema de reprodução, variabilidade e estrutura genética. Tais estudos podem ser eficientemente realizados com base em dados de marcadores bioquímicos, como isoenzimas. Entretanto, para que marcadores isoenzimáticos possam ser utilizados como marcadores genéticos é necessário conhecer *a priori* a sua herança (Furnier *et al.*, 1986; Gillet & Hattemer, 1989; Lewandowski, 2000). Outra informação genética importante no estudo do sistema de reprodução é o conhecimento da relação de segregação entre locos. A avaliação do sistema de reprodução por marcadores genéticos requer a suposição de equilíbrio de ligação (Ritland & Jain, 1981).

O objetivo deste trabalho foi investigar a herança e o desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos detectados em *C. echinata*. Foram usadas estruturas de progênies de polinização aberta, agrupadas por árvore materna heterozigota para o estudo da herança genética das isoenzimas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

O estudo foi realizado no arboreto experimental de pau-brasil (22°15'02,4"S e 47°09'28,9"W; altitude média 650 m) implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (22°14,8' - 15,6'S e 47°8,8' - 11,6'W, altitude média de 640 m), no município de Mogi Guaçu. A área total do arboreto é de 3.000 m<sup>2</sup>, aproximadamente, tendo sido implantado em dezembro de 1980, a partir de mudas originadas de sementes provenientes da Estação Ecológica de Tapacurá, Estado de Pernambuco, dentro da zona de ocorrência natural da espécie (Aguiar, 1992). Contudo, não existem informações sobre o número de árvores matrizes que deu origem às sementes utilizadas no plantio do arboreto. Inicialmente, sua implantação visava testar o efeito de diferentes espaçamentos sobre os parâmetros dendrométricos da espécie. Mas, devido ao quadro alarmante de erosão genética em que a espécie se encontra, esse arboreto passou

a ser visto como uma importante fonte potencial de material para a recombinação e uso da sua variabilidade genética. Atualmente, o arboreto tem 262 árvores com altura média de doze metros e diâmetro à altura do peito (DAP) em torno de 17 cm.

Para a análise genética de *C. echinata*, em 1999 foram coletadas sementes de polinização aberta em 27 árvores do arboreto. As sementes foram germinadas em substrato contendo uma mistura igual de terra vegetal, vermiculita e acícula de pinus peneirada. Tubetes, com capacidade de 100 cm<sup>3</sup>, foram utilizados como recipientes. As mudas foram mantidas nesse tipo de recipiente durante toda a fase de estudo, recebendo, entretanto, adubação mineral de manutenção, a cada sete dias aproximadamente. Alternava-se a aplicação de nitrogênio (2 mg de N/muda) e potássio (3 mg de K<sub>2</sub>O/muda).

### 2.2 Eletroforese

Em janeiro de 2002 foram coletadas folhas de 31 árvores adultas e de 10 plântulas (progênies) de 27 dessas árvores. Nos adultos procurou-se coletar folhas jovens. Nas plântulas coletaram-se folhas do terceiro par ou superior. O período de coletas foi na parte da manhã, em dias chuvosos ou na ausência de sol, proporcionados pela época do ano. As amostras, depois de identificadas e acondicionadas em sacos de papel *Kraft*, foram armazenadas em geladeira a 5°C por aproximadamente 24 horas, sendo então transportadas ao laboratório, onde foram submetidas às técnicas de eletroforese de isoenzimas, segundo as recomendações descritas em Soltis & Soltis (1989), Kephart (1990) e Alfenas (1998). Dezoito locos puderam ser interpretados em onze sistemas enzimáticos previamente selecionados (TABELA 1). O sistema SKDH (E.C. 1.1.1.25) demonstrou atividade apenas nas progênies. Esse loco foi utilizado para análises de estrutura entre as progênies, não sendo utilizado, entretanto, para as análises de diversidade e estrutura entre adultos e progênies. Para esse loco, os genótipos das árvores maternas foram determinados por meio da composição genotípica das progênies, usando o método de máxima verossimilhança de Brown & Allard (1970), implementado no programa MLTR de Ritland (2004).

TABELA 1 – Sistemas enzimáticos estudados em *C. echinata*.

Enzimas (Sigla) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados
Fosfatase ácida (ACP) E.C. 3.1.3.2	A	2
Diaforase (DIA) E.C. 1.8.1.4	A	3
$\alpha$ -Esterase ( $\alpha$ -EST) E.C. 3.1.1.1	A	2
Fosfoglucose isomerase (PGI) E.C. 5.3.1.9	A	1
	B	2
Glucose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) E.C. 1.1.1.49	A	2
Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) E.C. 2.6.1.1	A	1
Leucina aminopeptidase (LAP) E.C. 3.4.11.1	A	2
Malato desidrogenase (MDH) E.C. 1.1.1.37	A	2
	B	2
	C	3
Peroxidase (PRX) E.C. 1.11.1.7	A	3
	B	3
	C	3
	D	2
Xiquimato desidrogenase (SKDH) E.C. 1.1.1.25	A	2
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) E.C. 1.1.1.44	A	3
	B	3

E.C. = Enzyme Commission.

### 2.3 Análise de Segregação

Para o estudo da herança isoenzimática em *C. echinata* adotou-se o método descrito por Gillet & Hattemer (1989), que compara o genótipo de árvore materna com a segregação de suas progênes de polinização aberta. As seguintes condições devem ser satisfeitas: a) toda progênie de uma árvore materna  $A_iA_i$  deve possuir o alelo  $A_i$  da árvore mãe; b) Em casos de uma árvore mãe heterozigota (ex.  $A_iA_j$ ,  $i \neq j$ ): b.1) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna,  $A_i$ ,  $A_j$ ; b.2) o número de progênes heterozigotas  $A_iA_j$  ( $N_{ij}$ ) deve ser igual à soma das progênes homozigotas  $A_iA_i$  ( $N_{ii}$ ) e  $A_jA_j$  ( $N_{jj}$ ),  $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ ; b. 3) o número de progênes heterozigotas  $A_iA_k$  ( $N_{ik}$ ) deve ser igual ao número de progênes heterozigotas  $A_jA_k$  ( $N_{jk}$ ),  $N_{ik} = N_{jk}$ , com  $k \neq i, j$ . Inicialmente, os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. A somatória desses testes individuais possibilita avaliar a hipótese de segregação 1:1 por meio de um teste  $G$  (Weir, 1996).

Depois, os fenótipos observados de progênes de árvores heterozigotas de mesmo genótipo materno foram submetidos a um teste de homogeneidade ( $G_{Homogeneidade}$ ), no qual a hipótese nula é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de mesmo genótipo heterozigoto. No caso da não rejeição da hipótese de homogeneidade dos arranjos, um teste de aderência à proporção esperada de 1:1 foi realizado agrupando-se todos os arranjos individuais ( $G_{1:1Agrupado}$ ). Segundo Weir (1996), estes testes são aditivos, de forma que  $\sum G_{1:1} = \sum G_{Homogeneidade} + \sum G_{1:1Agrupado}$ , com distribuição de qui-quadrado e  $n$ ,  $n-1$  e 1 graus de liberdade, respectivamente. Se os testes de homogeneidade resultassem estatisticamente significativos, e considerando ainda o pequeno tamanho amostral de cada progênie (média de 10 plantas por progênie), as progênes que apresentaram desvios de segregação 1:1 foram descartadas e novos testes foram executados. Os locos foram designados com letras e números, e os alelos com números, em ordem decrescente de migração do ânodo para o cátodo.

## 2.4 Desequilíbrio de Ligação

O teste de equilíbrio de ligação foi analisado usando a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\Delta_{ij}$ ) (Weir, 1979). Essa medida é apropriada para situações em que existem indícios de que a união de gametas não ocorreu de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir & Cockerham, 1979). A hipótese nula de equilíbrio de ligação ( $\Delta_{ij} = 0$ ) foi testada com o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) descrito em Weir (1979). Essas estimativas foram obtidas com auxílio do programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Padrões das Isoenzimas

Dos onze sistemas isoenzimáticos avaliados, um era monomórfico (*Got-1*). Os demais apresentaram zonas de atividade enzimática com variações. A seguir é apresentada a descrição dos sistemas.

#### *Fosfatase ácida* (ACP)

O sistema ACP apresentou três zonas de atividade enzimática. A zona de migração mais rápida (catódica), denominada loco *Acp-1* apresentou duas variantes, indicando a segregação de dois alelos (FIGURA 1). As duas outras zonas (*Acp-2* e *Acp-3*) não apresentaram padrão de resolução que permitisse a interpretação genética. A avaliação de fenótipos de árvores heterozigotas revelou que esse loco é controlado por enzimas de expressão monomérica. Três zonas de atividades enzimáticas no sistema ACP também foram reportadas em *Cedrus atlantica* Manetti (Fallour *et al.*, 2001) e *Cecropia pachystachya* Trec. (Ribas *et al.*, 2004).

#### *Diaforase* (DIA)

O sistema enzimático DIA apresentou uma zona (*Dia-1*) de atividade nos géis (FIGURA 1), nas condições utilizadas em laboratório. A zona *Dia-1* foi interpretada como um loco polimórfico segregando três alelos. A observação dos fenótipos de árvores heterozigotas indicou que essa enzima é de expressão monomérica.

#### $\alpha$ -Esterase (EST)

O sistema EST apresentou três zonas de atividade enzimática. Contudo, apenas a zona de menor velocidade de migração apresentou-se plausível de interpretação (*Est-3*). Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico, de expressão monomérica, segregando dois alelos (FIGURA 1).

#### *Glucose-6-Fosfato Desidrogenase* (G6PDH)

O sistema G6PDH apresentou uma zona de atividade (FIGURA 1). Essa zona foi interpretada como um loco (*G6pdh-1*) polimórfico, monomérico, segregando dois alelos. Um simples loco controlando essa enzima também tem sido relatado em outros estudos realizados com espécies arbóreas (Morgante *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1994; Gusson *et al.*, 2004).

#### *Glutamato oxaloacetato transaminase* (GOT)

O sistema GOT apresentou somente uma zona de atividade enzimática (*Got-1*), aparentemente invariável (FIGURA 1) e interpretada como um loco monomórfico, com um alelo fixado.

#### *Leucina aminopeptidase* (LAP)

A enzima LAP apresentou uma zona de atividade, interpretada como um loco polimórfico (*Lap-1*) segregando dois alelos (FIGURA 1). A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos indica que esse loco é monomérico.

#### *Malato Desidrogenase* (MDH)

A enzima MDH apresentou três zonas de atividade, todas polimórficas e interpretáveis. O padrão observado em indivíduos heterozigotos sugere que esses locos são diméricos (FIGURA 1). As duas zonas de migração mais rápida (*Mdh-1*, *Mdh-2*) segregaram dois alelos cada, e a zona de migração mais lenta (*Mdh-3*) segregou três alelos. Três zonas de atividade nesse sistema isoenzimático também foram observadas em outras espécies arbóreas (Ying & Morgenstern, 1990; Huang *et al.*, 1994; Konnert *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002).

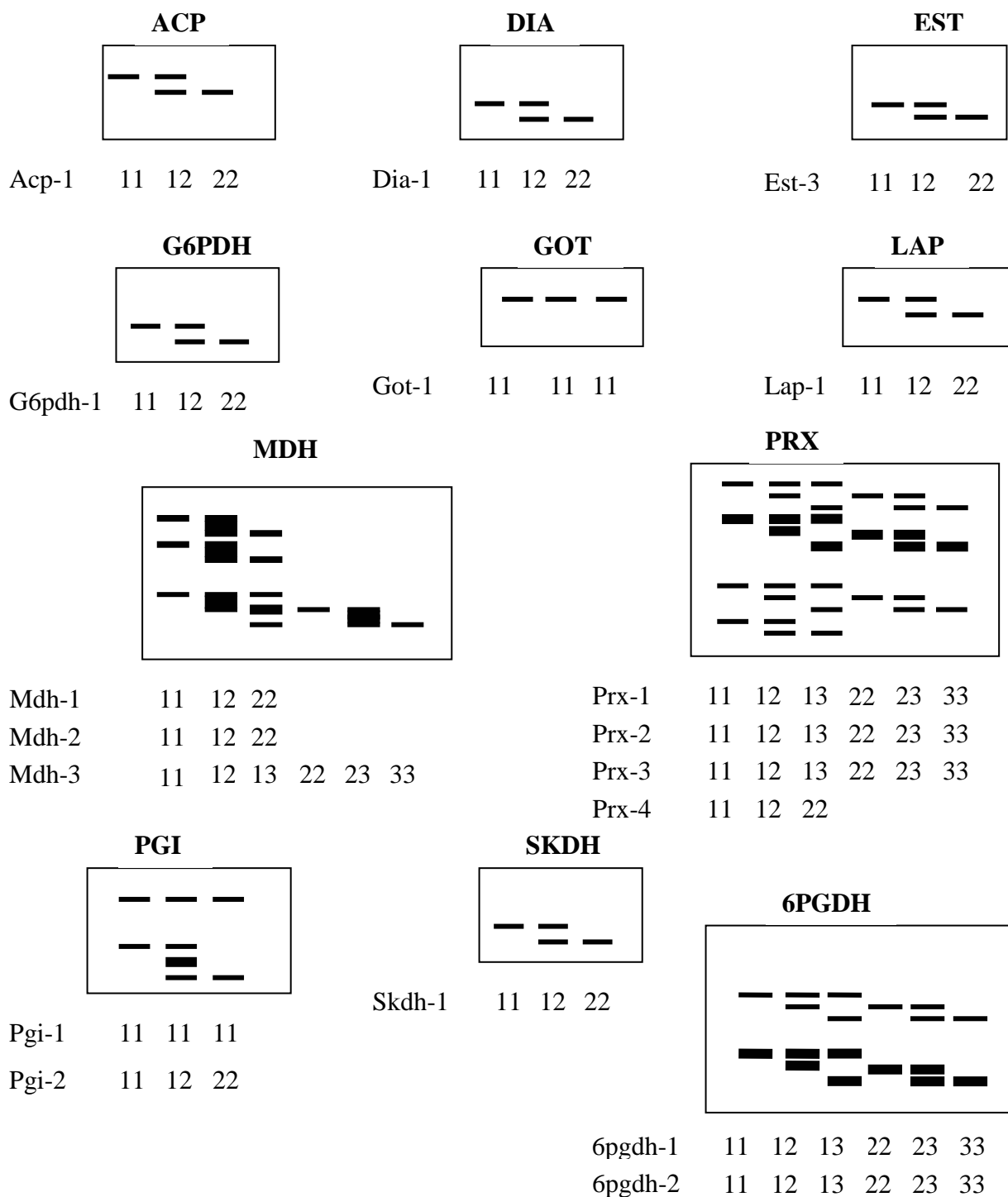


FIGURA 1 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *C. echinata* em onze sistemas enzimáticos.

### *Fosfoglucoase Isomerase* (PGI)

O sistema PGI apresentou duas zonas de atividade. A zona de migração mais rápida, denominada *Pgi-1* era monomórfica nos géis. A zona mais lenta (*Pgi-2*) era polimórfica e foi interpretada como um loco controlado por enzimas de expressão dimérica, segregando dois alelos (FIGURA 1). Duas zonas de atividade nessa enzima também foram detectadas em *Taxus baccata* L. (Lewandowski *et al.*, 1992), *Couratari guianensis* e *Couratari multiflora* (Lepsch-Cunha, 1996) e *Abies alba* Mill. (Hussendörfer *et al.*, 1995).

### *Peroxidase* (PRX)

O sistema PRX apresentou quatro zonas de atividade (*Prx-1*, *Prx-2*, *Prx-3* e *Prx-4*), todas polimórficas (FIGURA 1). O fenótipo de árvores heterozigotas indica que esses locos são controlados por enzimas de expressão monomérica. Nos locos *Prx-1*, *Prx-2* e *Prx-3* foram observadas as segregações de três alelos e no loco *Prx-4* a segregação de dois alelos.

### *Xiquimato Desidrogenase* (SKDH)

O sistema SKDH apresentou uma zona de atividades (*Skdh-1*) nas condições de eletroforese usadas (FIGURA 1). Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico, composto por uma enzima de expressão monomérica, segregando dois alelos. Expressão monomérica no sistema SKDH também foi observada em *Populus tremuloides* (Michx.) (Liu & Fournier, 1993).

### *6-Fosfogluconato Desidrogenase* (6PGDH)

O sistema 6PGDH apresentou duas zonas de atividade (FIGURA 1), interpretadas como locos polimórficos (*6pgdh-1*, *6pgdh-2*), de expressão monomérica, segregando três alelos cada. Outros estudos em espécies arbóreas relatam duas zonas de atividade na enzima 6PGDH (Ying & Morgenstern, 1990; Konnert *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002). Huang *et al.* (1994) estudando *Pinus massoniana* Lamb. observaram no sistema 6PGDH, tal como no presente trabalho, padrão fenotípico de indivíduos heterozigotos típico de enzimas monoméricas, embora em *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco (El-Kassaby *et al.*, 1982), *Cunninghamia lanceolata* Hook.

(Müller-Starck & Liu, 1988), *Thuja occidentalis* L. (Perry & Knowles, 1989) e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Sousa *et al.*, 2002) esse sistema tem apresentado fenótipo de enzima dimérica.

## 3.2 Padrões de Segregação

Do conjunto de 18 locos, 2 eram monomórficos (*Pgi-1* e *Got-1*) e 16 polimórficos. Destes últimos, em 3 (*Mdh-2*, *G6pdh-1* e *6pgdh-1*) não foram detectadas progênes descendentes de árvores heterozigotas na amostra e, portanto, não foi possível estudar os padrões de segregação. Nos demais, foram detectadas progênes de uma a dezesseis árvores heterozigotas, de forma que foi possível estudar os padrões de segregação agrupando-as para cada loco individualmente (TABELA 2).

A análise de segregação de progênes de árvores heterozigotas de *C. echinata* detectou indícios de desvios da razão esperada 1:1 em todos os 13 locos possíveis de análise, exceção ao loco *Est-3*, das progênes oriundas dos maternais  $A_1A_2$  e  $A_2A_3$  do loco *Prx-1* e  $A_1A_2$  do loco *6pgdh-2* (TABELA 2). Portanto, nos doze locos restantes, ao menos um tipo de progênie apresentou desvio da segregação esperada 1:1. Entretanto, quando são excluídas as progênes não homogêneas ou que apresentaram desvios significativos, a maioria dos locos analisados (dez) não rejeita a hipótese de segregação regular de 1:1. Percebe-se pela TABELA 2 que, de fato, poucas progênes se desviam da segregação mendeliana e quando estas são retiradas da análise, a relação 1:1 é satisfeita. A exclusão de progênes variou de 20% para o loco *Dia-1* a 50% para os locos *Mdh-1* e *Prx-3*, contudo, o pequeno número de maternais heterozigotas nestes locos justifica uma exclusão maior, ao passo que locos que tiveram um número maior de árvores mães heterozigotas, poucas progênes foram excluídas, reforçando que estes locos não rejeitam a hipótese de segregação regular 1:1. Assim, por essas análises, os locos *Acp-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1* e *6pgdh-2* não apresentam qualquer indício de desvios de segregação e podem ser usados em futuras análises genéticas populacionais.

TABELA 2 – Teste para hipótese de segregação regular (valor G) em marcadores isoenzimáticos de *C. echinata*.

Loco	Genótipo materno	Situação	n	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$	$\Sigma G$	$\Sigma G$	$\Sigma G$	
						1:1 GL = n	Homogeneidade GL = n-1	1:1 Agrupado GL = 1	
<i>Acp-1</i>	$A_1A_2$	a	10	33:51	–	28,43**	24,54**	3,89*	
		b	7	22:35		9,74	6,75	2,99	
<i>Dia-1</i>	$A_2A_3$	a	15	77:45	0:0	45,53* <sup>G1</sup>	37,04 <sup>G2</sup>	8,49* <sup>G3</sup>	
		b	12	54:44	0:0	18,54 <sup>G1</sup>	17,52 <sup>G2</sup>	1,02 <sup>G3</sup>	
<i>Est-3</i>	$A_1A_2$	a	2	6:9	–	0,79	0,19	0,60	
<i>Lap-1</i>	$A_1A_2$	a	8	10:42	–	34,15*	12,98	21,17**	
		b	5	9:19		7,38	3,73	3,65	
<i>Mdh-1</i>	$A_1A_2$	a	4	9:23	–	22,53**	16,19**	6,34*	
		b	2	9:8		1,73	1,67	0,06	
<i>Mdh-3</i>	$A_2A_3$	a	16	74:40	3:9	63,86** <sup>G1</sup>	50,43* <sup>G2</sup>	13,43** <sup>G3</sup>	
		b	12	41:39	3:9	23,01 <sup>G1</sup>	19,82 <sup>G2</sup>	3,19 <sup>G3</sup>	
<i>Pgi-2</i>	$A_1A_2$	a	15	95:35	–	97,23**	68,46**	28,77**	
		b	8	53:19		29,61**	12,89*	16,71**	
<i>Prx-1</i>	$A_1A_2$	a	7	6:19	1:6	24,39* <sup>G1</sup>	13,32 <sup>G2</sup>	11,07** <sup>G3</sup>	
		b	4	6:8	0:3	6,37 <sup>G1</sup>	1,92 <sup>G2</sup>	4,45 <sup>G3</sup>	
	$A_1A_3$	a	2	2:7	0:1	5,49 <sup>G1</sup>	1,16 <sup>G2</sup>	4,33 <sup>G3</sup>	
	$A_2A_3$	a	3	3:15	0:0	9,93 <sup>G1</sup>	1,20 <sup>G2</sup>	8,73* <sup>G3</sup>	
		b	2	2:8	0:0	4,87 <sup>G1</sup>	1,01 <sup>G2</sup>	3,85 <sup>G3</sup>	
<i>Prx-2</i>	$A_1A_3$	a	8	45:2	8:8	75,32** <sup>G1</sup>	26,70* <sup>G2</sup>	48,62** <sup>G3</sup>	
		b	2	7:1	8:2	19,21** <sup>G1</sup>	10,29** <sup>G2</sup>	8,92* <sup>G3</sup>	
	$A_2A_3$	a	15	17:10	5:75	98,40** <sup>G1</sup>	23,07 <sup>G2</sup>	75,33** <sup>G3</sup>	
		b	4	6:5	4:14	9,20 <sup>G1</sup>	3,22 <sup>G2</sup>	5,98 <sup>G3</sup>	
<i>Prx-3</i>	$A_1A_2$	a	3	9:3	10:7	17,28** <sup>G1</sup>	13,61** <sup>G2</sup>	3,67 <sup>G3</sup>	
		b	2	6:3	3:7	3,42 <sup>G1</sup>	0,76 <sup>G2</sup>	2,66 <sup>G3</sup>	
	$A_1A_3$	a	8	15:21	8:16	51,03** <sup>G1</sup>	47,31** <sup>G2</sup>	3,72 <sup>G3</sup>	
		b	4	10:9	3:5	9,11 <sup>G1</sup>	8,55 <sup>G2</sup>	0,56 <sup>G3</sup>	
<i>Prx-4</i>	$A_1A_2$	a	8	17:33	–	30,37**	25,16**	5,21*	
		b	3	6:12		2,52	0,48	2,04	
<i>Skdh-1</i>	$A_1A_2$	a	4	4:26	–	22,27**	4,24	18,03**	
		b	2	3:9		3,59	0,45	3,14	
<i>6pgdh-2</i>	$A_1A_2$	a	1	7:3	0:0	1,65 <sup>G1</sup>	0,00 <sup>G2</sup>	1,65 <sup>G3</sup>	
		$A_2A_3$	a	9	29:47	0:0	32,81** <sup>G1</sup>	28,51* <sup>G2</sup>	4,30 <sup>G3</sup>
			b	6	19:31	0:0	9,55 <sup>G1</sup>	6,64 <sup>G2</sup>	2,91 <sup>G3</sup>

$N_{ij}$  e  $N_{ii} + N_{jj}$  são os números observados de genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

$N_{ik}$  e  $N_{jk}$  são os números observados de genótipos heterozigotos do tipo *ik* e *jk*, respectivamente.

n = número de árvores maternas.

a) Incluí todas as árvores heterozigotas em um dado loco.

b) Excluí as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(\*)  $P < 0,05$ .

(\*\*)  $P < 0,01$ .

G1 = 2n graus de liberdade; G2 = 2n-2 graus de liberdade e G3 = 2 graus de liberdade.

Os locos *Pgi-2* e *Prx-2* apresentaram desvios altamente significativos ( $P < 0,01$ ) tanto para a hipótese de segregação agrupada 1:1 ( $G_{1:1Agrupado}$ ) quanto para a total ( $G_{1:1}$ ) de progênies de árvores heterozigotas. Os desvios nesses locos seguiram significativos, mesmo com a exclusão das progênies não homogêneas. O excesso de plântulas heterozigotas, filhas de árvores heterozigotas, é a causa principal desses desvios. Já o loco *Prx-4* também apresenta desvios altamente significativos ( $P < 0,01$ ) para as hipóteses de segregação regular e de homogeneidade dos arranjos gaméticos. Ao se fazer a exclusão das progênies significativas, uma relação de satisfação dessas hipóteses é obtida, entretanto, dado que mais da metade (62,5%) das progênies tem de ser excluída para que se obtenha uma segregação regular, não é razoável supor que esse loco tenha, para a espécie em estudo, o modo de herança esperado. Ao contrário dos locos *Pgi-2* e *Prx-2*, o loco *Prx-4* apresenta um excesso de homozigotos. Segundo Gillet & Hattemer (1989), isso pode estar sugerindo a presença de um alelo nulo nesse loco. Esses autores propõem um teste, segundo o qual progênies oriundas do maternal  $A_iA_0$  ( $i \neq 0$ ) teriam uma expectativa fenotípica de  $N_{00} \leq N_{i-}$  e  $N_{k-} = N_{ik}$  ( $k \neq 0, i$ ). Realizou-se este teste para o loco *Prx-4*, tanto para o maternal  $A_1A_0$  quanto para o maternal  $A_2A_0$  e, nas duas situações, a hipótese de existência de um alelo nulo atuando nesse loco foi rejeitada ( $N_{00} = 0$ ,  $N_{1-} = 35$ ,  $N_{2-} = 0$  e  $N_{12} = 25$  para as progênies cujos maternais são do tipo  $A_1A_0$  e  $N_{00} = 0$ ,  $N_{2-} = 14$ ,  $N_{1-} = 0$  e  $N_{12} = 27$  para as progênies de maternais  $A_2A_0$ ). Conclui-se que esses locos não têm um modo hereditário regular.

Vários estudos realizados com locos isoenzimáticos em espécies arbóreas têm detectado desvios de segregação. Por exemplo, Furnier *et al.* (1986) observaram desvios da razão de segregação esperada 1:1 nos locos *Fle-1*, *Pgi-4* e *Mdh-4* em *Pinus albicaulis* Engelman. Perry & Knowles (1989) relatam desvios de segregação no loco *Mdh-1* em *Thuja occidentalis* L. Em *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch., Cheliak & Pitel (1985)

descrevem desvios de segregação nos locos *G6pdh* e *Pgi-2* e Ying & Morgenstern (1990) no loco *Acp-1*. Em *A. angustifolia*, Sousa *et al.* (2002) detectaram desvios de segregação no loco *Got-b*. Desvios de segregação em locos isoenzimáticos também são descritos em outros trabalhos (Adams & Joly, 1980; Morgante *et al.*, 1993). A causa tem sido atribuída ao fato das isoenzimas poderem estar sob controle de mais de um loco, não estarem sob controle genético, seleção, distorções meióticas, interações interalélicas, acaso (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985) e ligação dos marcadores a alelos deletérios (Strauss & Conkle, 1986).

### 3.3 Desequilíbrio de Ligação

Foram observados indícios de desequilíbrio de ligação em locos de *C. echinata* (TABELA 3). Considerando as 120 combinações possíveis, entre os 16 locos polimórficos, foram detectados valores significativos de desequilíbrio de ligação entre seis pares envolvendo nove locos: *Mdh-3:Dia-1*, *Mdh-3:Prx-3*, *6pgdh-1:Pgi-2*, *6pgdh-1:Prx-1*, *6pgdh-2:Prx-3* e *Pgi-2:Prx-4*. O maior valor de desequilíbrio de ligação significativo foi observado entre os locos *Mdh-3:Prx-3* ( $\hat{\Delta}_{ij} = 0,028$ ,  $\chi^2 = 4,86$ ,  $P = 0,027$ ), embora este valor ainda seja extremamente baixo. O loco *Pgi-2* não apresentou segregação mendeliana simples e, por isso, será descartado, quebrando-se, assim, dois grupos de ligação observados (*6pgdh-1:Pgi-2* e *Pgi-2:Prx-4*). Adicionalmente, sugere-se a exclusão dos locos *Prx-1*, envolvido em um grupo de ligação (*6pgdh-1:Prx-1*), e *Prx-3* envolvido em dois grupos de ligação (*Mdh-3:Prx-3* e *6pgdh-2:Prx-3*). Nos demais pares de locos não foram detectados quaisquer indícios de desequilíbrio de ligação e podem ser usados em subseqüentes estudos que requeiram o equilíbrio gamético, como análises do sistema de reprodução, cálculos de parentescos, testes de paternidade e quantificação da diversidade e estrutura genética de *C. echinata*.

TABELA 3 – Valores da medida composta de desequilíbrio gamético de Burrows ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ), resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e probabilidade associada ( $P$ ) para pares de locos isoenzimáticos que apresentaram desvios significativos da hipótese de desequilíbrio gamético em populações de *C. echinata*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$P$
<i>Mdh-3:Dia-1</i>	0,001	6,25*	0,012
<i>Mdh-3:Prx-3</i>	0,028	4,86*	0,027
<i>6pgdh-1:Pgi-2</i>	0,005	4,20*	0,040
<i>6pgdh-1:Prx-1</i>	-0,004	4,48*	0,034
<i>6pgdh-2:Prx-3</i>	0,027	5,34*	0,021
<i>Pgi-2:Prx-4</i>	0,026	4,33*	0,037

(\*)  $P < 0,05$ .

#### 4 CONCLUSÕES

A herança mendeliana simples foi confirmada para dez locos (*Acp-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1* e *6pgdh-2*) avaliados em *C. echinata*. Três locos (*Pgi-2*, *Prx-2* e *Prx-4*) apresentaram desvios altamente significativos para a hipótese de segregação regular 1:1.

Os pares de locos *Mdh-3:Dia-1*, *Mdh-3:Prx-3*, *6pgdh-1:Pgi-2*, *6pgdh-1:Prx-1*, *6pgdh-2:Prx-3* e *Pgi-2:Prx-4* encontram-se ligados ou em equilíbrio gamético, assim, um loco de cada par deve ser excluído para estudos genéticos que requeiram segregação independente entre locos.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento do Projeto (Processo 2000/06422-4).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 71, p. 33-40, 1980.

AGUIAR, F. F. A. Comportamento ecológico de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), cultivado em arboreto experimental. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 16, n. 3, p. 255-261, 1992.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 574 p.

BRASIL. Portaria IBAMA nº 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 130, n. 16, 23 jan. 1992. Seção I.

BROWN, A. H. D.; ALLARD, R. W. Estimation of mating system in open-pollinated maize populations using isozymes polymorphisms. **Genetics**, Washington, D.C., v. 66, p. 133-145, 1970.

CARDOSO, M. A. *et al.* High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinoideae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 601-608, 1998.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.

CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 34, p. 142-148, 1985.

EL-KASSABY, Y.A.; YEH, F.C.; SZIKLAI, O. Inheritance of allozyme variants in Coastal Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 24, p. 325-335, 1982.

FALLOUR, D.; FADY, B.; LEFÈVRE, F. Evidence of variation in segregation patterns within a Cedrus population. **The J. of Heredity**, Cary, v. 92, p. 260-266, 2001.

FURNIER, G. R. *et al.* Inheritance and linkage of allozymes in seed tissues of whitebark pine. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 28, p. 601-604, 1986.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.

- GUSSON, E.; SEBBENN, A. S. Herança e desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos de *Eschweilera ovata*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 129-136, 2004.
- HUANG, Q. Q. *et al.* Genetic control of isozyme variation in Masson Pine, *Pinus massoniana* Lamb. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 285-292, 1994.
- HUSSENDÖRFER, E.; KONNERT, M.; BERGMANN, F. Inheritance and linkage of isozymes variants of Silver Fir (*Abies alba* Mill.). **Forest Genetics**, Zvolen, v. 2, p. 29-40, 1995.
- KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 77, n. 5, p. 693-712, 1990.
- KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. I. Inheritance of isozymes variants. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 25-37, 2001.
- LEPSCH-CUNHA, N. **Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia Central.** 1996. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- LEWANDOWSKI, A. Inheritance and linkage of some allozymes in *Pinus armandii* Franch. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 79-82, 2000.
- \_\_\_\_\_.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 342-347, 1992.
- LIU, Z.; FURNIER, G. R. Inheritance and linkage of allozymes and restriction fragment length polymorphisms in Trembling Aspen. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 419-424, 1993.
- MELLO-FILHO, L. E. A Floresta Atlântica. In: MONTEIRO, S; KAZ, L. (Coord.). **Floresta Atlântica: textos científicos.** Rio de Janeiro: Alumbramento, 1991/1992. p. 17-21.
- MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G. G.; GIANNINI, R. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Pinus leucodermis* Ant. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 231-236, 1993.
- MÜLLER-STARCK, G.; LIU, Y. Q. Genetics of *Cunninghamia lanceolata* Hook. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 236-243, 1988.
- PERRY, D. J.; KNOWLES, P. Inheritance and linkage relationships of allozymes of eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) in northwestern Ontario. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 245-250, 1989.
- RIBAS, L. A., SEBBENN, A. S. Herança e desequilíbrio de ligação em sete locos isoenzimáticos de *Cecropia pachystachya*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 111-119, 2004.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR:** Version 2.4. Toronto: University of Toronto, 2002. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs>>. Acesso em: 30 mar. 2004.
- \_\_\_\_\_.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, Oxford, v. 47, p. 35-52, 1981.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. **Isozymes in plant biology.** Portland: Dioscorides Press, 1989. 268 p.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, p. 191-196, 2002.
- STRAUSS, S. H.; CONKLE, M. T. Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone pine. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, v. 72, p. 483-493, 1986.
- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.
- \_\_\_\_\_. **Genetic data analysis II:** method for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.
- \_\_\_\_\_.; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity**, Lund, v. 43, p. 105-111, 1979.
- YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32:** Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. Edmonton: University of Alberta, 1999. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>>. Acesso em: 30 mar. 2004.
- YING, L.; MORGENSTERN, E.K. Inheritance and linkage relationships of some isozymes of *Larix laricina* in New Brunswick, Canada. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 39, p. 245-251, 1990.

# HERANÇA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM SETE LOCOS ISOENZIMÁTICOS DE *Cecropia pachystachya*\*

Luciano Arruda RIBAS\*\*  
Alexandre Magno SEBBENN\*\*\*

## RESUMO

Seis sistemas enzimáticos (ACP, G6PDH, IDH, PGI, PGM e SKDH), codificando sete locos polimórficos (*Acp-3*, *G6pdh-1*, *Idh-1*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-2* e *Skdh-1*), foram investigados para a herança e desequilíbrio de ligação em *Cecropia pachystachya* Trec. A herança mendeliana foi confirmada para todos os locos avaliados. Desvios significativos da razão de segregação esperada 1:1 foram detectados apenas em uma progênie de árvore heterozigótica. O desequilíbrio de ligação foi examinado para 21 pares de locos isoenzimáticos, não sendo detectados desequilíbrios entre nenhum deles e, assim, estes podem ser utilizados em subseqüentes estudos do sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética de *C. pachystachya*.

Palavras-chave: herança; *Cecropia pachystachya*; espécies arbóreas tropicais.

## 1 INTRODUÇÃO

*Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae) é uma importante espécie para reflorestamentos ambientais, por suas características de hábito pioneiro e rápido crescimento. A espécie é dióica, polinizada pelo vento, produz grande quantidade de sementes dispersas por pássaros e morcegos. *C. pachystachya* tem distribuição ampla, indo desde o Estado do Ceará a Santa Catarina. Sua ocorrência é rara no interior da mata primária densa, mas é comum em matas secundárias e capoeiras novas (Lorenzi, 1992).

Em virtude do interesse crescente pela espécie para reflorestamentos ambientais, faz-se necessário o conhecimento detalhado do seu sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética. Tais informações podem ser obtidas por meio de marcadores genéticos, como as isoenzimas. Contudo, para que marcadores isoenzimáticos possam ser usados como marcadores genéticos, é necessário o conhecimento prévio de sua herança (Gillet & Hattemer, 1989; Liu & Furnier, 1993; Pastorino & Gallo, 1998; Lewandowsky, 2000). Adicionalmente, em estudos populacionais, na maioria das vezes,

## ABSTRACT

Six isozyme systems (ACP, G6PDH, IDH, PGI, PGM and SKDH) codifying for seven polymorphic loci (*Acp-2*, *G6pdh-1*, *Idh-1*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-2* and *Skdh-1*) were investigated for inheritance and gametic disequilibrium in *Cecropia pachystachya* Trec. Mendelian inheritance was confirmed for all available loci. Significant segregation deviations from expected ratio 1:1 were detected only in one family from heterozygous tree. Linkage disequilibrium was examined for 21 pairs of allozyme loci. No linkage disequilibrium was detected in the pairs of loci studied. These loci can be used in subsequent mating system, genetic diversity and structure studies of *C. pachystachya*.

Key words: inheritance; *Cecropia pachystachya*; tropical tree species.

são estimadas médias entre locos ou é necessária a utilização de locos com segregação independente (sistema de reprodução, análise de paternidade), de forma que os locos devem ser primeiramente submetidos a um estudo de desequilíbrio de ligação. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi examinar a herança e o desequilíbrio de ligação em sete locos isoenzimáticos detectados em populações de *C. pachystachya*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem das Progênies

Sementes de polinização aberta foram coletadas em 23 árvores de duas populações naturais de *C. pachystachya*, localizadas em fragmentos do Estado de São Paulo: Estação Ecológica dos Caetetus (Latitude 22°22'S, Longitude 49°40'W) e Reserva Florestal de Santa Genebra (Latitude 22°49'S, Longitude 47°06'W), ambas administradas pelo Instituto Florestal.

(\*) Aceito para a publicação em outubro de 2004.

(\*\*) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 15, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. (Bolsista da FAPESP).

(\*\*\*) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

De cada árvore foram analisados, via eletroforese de isoenzimas, tecidos foliares de dez plântulas. O genótipo das árvores maternas foi determinado da composição genotípica de suas progênes, usando-se o método de máxima verossimilhança de Brown & Allard (1970), implementado no programa MLTR de Ritland (1998).

## 2.2 Eletroforese em Gel de Amido

As enzimas de *C. pachystachya* foram extraídas de tecidos foliares de plântulas empregando-se, aproximadamente, 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP 40), 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP-360) e 200 microlitros da solução de extração número 1 de Alfenas (1998, p. 96). A eletroforese foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel a 13% de concentração, com 2/3 de amido de milho (penetrose 30), combinado com 1/3 de amido de batata (Sigma). As corridas foram realizadas em geladeira, com temperatura de 5°C. O tampão de cuba e gel utilizado foi o número 25 (DL-histidina, pH 8,0) citado em Alfenas (1998, p. 123). As enzimas reveladas foram a fosfatase ácida (ACP; E.C. 3.1.3.2), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; E.C. 1.1.1.49), isocitrato desidrogenase (IDH; E.C. 1.1.1.42), fosfoglucose isomerase (PGI; E.C. 5.3.1.9), fosfoglucomutase (PGM; E.C. 5.4.2.2) e xiquimato desidrogenase (SKDH; E.C. 1.1.1.25). A forma de revelação dessas isoenzimas foi a mesma descrita em Alfenas (1998).

## 2.3 Análise de Segregação

O estudo da herança de *C. pachystachya* foi realizado pelo método descrito por Gillet & Hattemer (1989), que compara o genótipo da árvore materna com a segregação de suas progênes de polinização aberta. As pressuposições do método são: a) toda progênie de uma árvore materna  $A_iA_i$  deve possuir o alelo  $A_i$  da árvore mãe; b) em casos de uma árvore mãe heterozigótica (ex.  $A_iA_j$ ,  $i \neq j$ ): (i) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna,  $A_i$  ou  $A_j$ ; (ii) o número esperado de progênes heterozigóticas  $A_iA_j$  ( $N_{ij}$ ) é igual à soma das progênes homozigóticas  $A_iA_i$  ( $N_{ii}$ ) e  $A_jA_j$  ( $N_{jj}$ ),  $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ , e (iii) o número esperado de progênes heterozigóticas  $A_iA_k$  ( $N_{ik}$ ) é igual ao número de progênes heterozigóticas  $A_jA_k$  ( $N_{jk}$ ),  $N_{ik} = N_{jk}$ , com  $k \neq i, j$ .

A análise genética foi realizada com 10 plantas de cada uma das 23 progênes de polinização aberta avaliadas em *C. pachystachya*. Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigóticas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. A hipótese foi rejeitada ou aceita com base em um teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) padrão, corrigido para pequenas amostras (correção de Yates). Em seguida, os valores de qui-quadrado individuais foram somados e um valor de qui-quadrado total para a segregação 1:1 foi obtido ( $\sum \chi^2_{Hipótese1:1}$ ). Simultaneamente, os fenótipos observados de progênes de árvores heterozigóticas de mesmo genótipo materno foram somados e um teste de qui-quadrado agrupado foi obtido ( $\chi^2_{1:1Agrupado}$ ). A hipótese nula desse teste é a de igual proporção dos tipos de gametas nas progênes produzidas por diferentes árvores maternas de mesmo genótipo heterozigoto. Posteriormente, testou-se a hipótese de heterogeneidade de segregação entre progênes, usando-se um teste de qui-quadrado de heterogeneidade ( $\sum \chi^2_{Heterogeneidade}$ ), obtido pela subtração do teste de qui-quadrado agrupado ( $\chi^2_{1:1Agrupado}$ ), do teste de qui-quadrado total ( $\sum \chi^2_{Hipótese1:1}$ ). Esses testes de qui-quadrado são aditivos de forma que  $\sum \chi^2_{Hipótese1:1} = \sum \chi^2_{Heterogeneidade} + \chi^2_{1:1Agrupado}$ , com  $n$ ,  $n-1$  e  $I$  graus de liberdade, respectivamente (Mather, 1963). Os locos foram designados com letras e números, e os alelos com letras, em ordem decrescente de migração do ânodo para o cátodo.

## 2.4 Análise de Desequilíbrio de Ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows,  $\Delta_{ij}$  (Weir, 1979), usando o programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows é a mais indicada em situações em que a união de gametas pode não ter ocorrido de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir & Cockerham, 1979). A hipótese de segregação independente foi testada com o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) descrito em Weir (1979).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Padrões Isoenzimáticos

Os seis sistemas isoenzimáticos avaliados em *C. pachystachya* apresentaram, pelo menos, uma zona de atividade com variação. Os padrões de herança desses sistemas foram:

##### *Fosfatase ácida (ACP)*

A enzima ACP apresentou três zonas de atividades (*Acp-1*, *Acp-2* e *Acp-3*) (FIGURA 1). A zona de migração mais rápida (*Acp-1*) não apresentou padrão de revelação que permitisse a correta interpretação, sendo descartada da interpretação genética. A segunda (*Acp-2*) e a terceira zonas (*Acp-3*) apresentaram padrões que possibilitaram a interpretação genética. A zona denominada *Acp-2* apresentou variação e foi interpretada como um loco monomérico apresentando dois alelos. A terceira zona, *Acp-3*, não apresentou variação e foi interpretada como um loco monomórfico. Em *Cedrus atlantica* Manetti (Fallour *et al.*, 2001) também foram detectadas três zonas de atividade na enzima ACP, embora em outras espécies como, por exemplo, *Salix viminalis* L. (Thorsén *et al.*, 1997) apenas uma zona de atividade tenha sido observada.

##### *Glucose 6 Fosfato Desidrogenase (G6PDH)*

A enzima G6PDH apresentou uma zona de atividade (*G6pdh-1*), interpretada como um loco polimórfico, apresentando três alelos (FIGURA 1). Um simples loco controlando essa enzima também tem sido relatado em *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch (Ying & Morgenstern, 1990), *Larix decidua* Mill. (Lewandowski & Mejnartowicz, 1990), *Pinus leucodermis* Ant. (Morgante *et al.*, 1993) e *Pinus massoniana* Lamb. (Huang *et al.*, 1994). Observando os zimogramas nos géis de indivíduos heterozigóticos, verificou-se que o fenótipo isoenzimático continha duas bandas, típico de enzimas monoméricas.

##### *Isocitrato Desidrogenase (IDH)*

Apenas uma simples zona de atividade enzimática foi detectada nessa enzima IDH. Essa zona foi interpretada como um loco de expressão dimérica, apresentando três alelos (FIGURA 1).

Na mesma enzima, uma zona de atividade foi reportada em *Pinus taeda* L. (Adams & Joly, 1980), *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco (El-Kassaby *et al.*, 1982) e *Cedrus atlantica* Menetti (Fallour *et al.*, 2001).

##### *Fosfogluose Isomerase (PGI)*

O sistema PGI apresentou duas zonas de atividades, ambas com polimorfismo e denominadas locos *Pgi-1* e *Pgi-2* (FIGURA 1). Contudo, a revelação da zona de migração mais rápida (*Pgi-1*) não apresentou padrão suficiente que permitisse sua correta interpretação. A segunda zona foi interpretada como um loco polimórfico (*Pgi-2*) apresentando três alelos. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigóticos detectou três bandas, o que é típico de enzima dimérica. Duas zonas de atividade nesse sistema têm sido detectadas em outras espécies arbóreas (Lewandowski *et al.*, 1992; Pastorino & Gallo, 2001; Sousa *et al.*, 2002).

##### *Fosfoglucomutase (PGM)*

O sistema PGM apresentou duas zonas de atividade enzimática (*Pgm-1* e *Pgm-2*), ambas polimórficas e apresentando dois alelos em cada loco (FIGURA 2). Observando os zimogramas de árvores heterozigóticas verifica-se a presença de três bandas, indicando tratar-se de locos diméricos. Duas zonas de atividade também foram observadas em *P. taeda* (Adams & Joly, 1980), *P. menziesii* var. *menziesii* (El-Kassaby *et al.*, 1982) e em *Acer pseudoplatanus* L. (Konnert *et al.*, 2001).

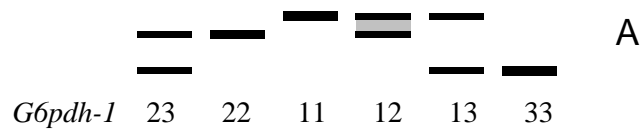
##### *Xiquimato Desidrogenase (SKDH)*

O sistema SKDH apresentou uma zona de atividade nos géis (*Skdh-1*). Essa foi interpretada como um loco polimórfico, composto por uma enzima de expressão monomérica e apresentando dois alelos (FIGURA 2). Expressão monomérica no sistema SKDH também foi observada em *Populus tremuloides* Michx. (Liu & Furnier, 1993), *Cunninghamia konishii* Hay (Wang & Lin, 1998) e *Araucaria angustifolia* (Mart.) O. Ktze. (Sousa *et al.*, 2002). Em *P. tremuloides* (Liu & Furnier, 1993) foi igualmente detectada uma zona de atividade no sistema SKDH, embora em outras espécies arbóreas tenham sido relatados dois locos (Wang & Lin, 1998; Sousa *et al.*, 2002).

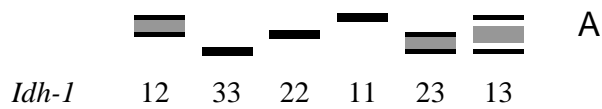
Fosfatase Ácida (ACP)



Glucose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH)



Isocitrato Desidrogenase (IDH)



Fosfoglucoase Isomerase (PGI)

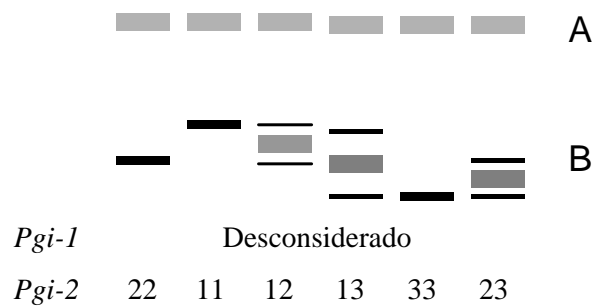
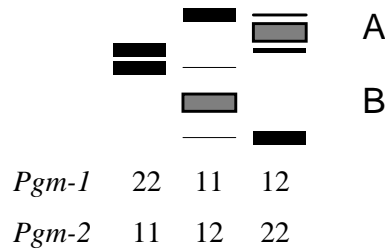


FIGURA 1 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *C. pachystachya* nos sistemas ACP, G6PDH, IDH e PGI, juntamente com seus respectivos genótipos.

## Fosfoglucomutase (PGM)



## Xiquimato Desidrogenase (SKDH)

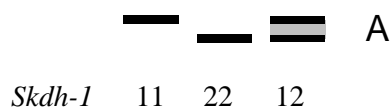


FIGURA 2 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *C. pachystachya* nos sistemas PGM e SKDH, juntamente com seus respectivos genótipos.

### 3.2 Padrões de Segregação

Os valores do teste de qui-quadrado para a segregação esperada total 1:1 ( $\chi^2_{Hipótese1:1}$ ), de heterogeneidade entre progênies ( $\chi^2_{Heterogeneidade}$ ) e agrupado ( $\chi^2_{1:1Agrupado}$ ), em *C. pachystachya* (TABELA 1), evidenciaram indícios de desvios de segregação mendeliana em apenas um loco. O loco *Pgm-2* apresentou desvios significativos da razão esperada de segregação total 1:1 ( $\sum \chi^2_{Hipótese1:1} = 16,74$ ,  $P < 0,05$ ) e de heterogeneidade ( $\chi^2_{Heterogeneidade} = 14,07$ ,  $P < 0,05$ ). O teste de heterogeneidade indica que as progênies de mesmo genótipo materno heterozigótico estão segregando de forma diferente. Os desvios nos testes de segregação total e de heterogeneidade foram causados pelo desvio de segregação detectado em uma árvore heterozigótica  $A_1A_2$  ( $\chi^2 = 9,80$ ,  $P < 0,01$ ), onde se observou que os descendentes eram todos homozigotos para os dois alternativos alelos ( $A_1$  e  $A_2$ ) e nenhum heterozigoto foi observado. Os desvios de segregação observados na descendência da referida árvore podem ter sido causados por erro de amostragem, devido ao pequeno tamanho amostral usado para o teste (10 progênies), seleção entre a meiose e a fertilização ou forte ligação entre os alelos isoenzimáticos e genes deletérios.

O ideal é que os testes de segregação sejam baseados em grandes amostras (> 20 plantas por progênie), a fim de reduzir a chance de se detectar desvios de segregação devido à variação amostral aleatória. Por isso, os presentes resultados devem ser vistos com cautela, e novos testes, baseados em grande número de descendentes por árvore materna heterozigota, são desejados para confirmar os presentes resultados. A seleção entre a fase de meiose e a fertilização e a ligação entre os alelos isoenzimáticos e genes deletérios poderiam causar desvios de segregação pelo favorecimento (ou desfavorecimento) de certos alelos (seleção) ou pela exclusão de certos genótipos (ligação). Mas no presente caso, tais hipóteses são pouco prováveis de explicarem o desvio observado, visto que um dos alelos materno deveria estar em baixa freqüência, o que não aconteceu, ambos alelos maternos apresentaram freqüência igual (0,5). Uma outra explicação seria a presença de forte endogamia, que no caso de *C. pachystachya* poderia ser atribuída ao cruzamento entre parentes, considerando tratar-se de espécie dióica. O cruzamento entre parentes leva ao aumento da homozigose, o que explicaria a detecção somente de progênies homozigóticas. Contudo, quando a referida árvore foi excluída do conjunto de dados, os testes de segregação esperada total 1:1 e de heterogeneidade ajustaram-se à hipótese de segregação mendeliana 1:1. Assim, não se rejeita a hipótese de que esse também esteja segregando na proporção 1:1.

TABELA 1 – Teste para hipótese de segregação regular ( $\chi^2$ ) de marcadores isoenzimáticos em *C. pachystachya*.

Loco	Genótipo materno	Caso	Número de árvores (n)	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$	$\sum \chi^2$ Hipótese 1:1 $GL = n$	$\sum \chi^2$ Heterogeneidade $GL = n-1$	$\chi^2$ 1:1 Agrupado $GL = 1$	Árvores com desvio de segregação
<i>Acp-2</i>	$A_1A_2$	a	6	30:27	–	0,40	0,24	0,16	
<i>G6pdh-1</i>	$A_1A_3$	a	2	8:9	2:0	7,00 <sup>G1</sup>	4,78 <sup>G2</sup>	2,22 <sup>G3</sup>	
	$A_2A_3$	a	5	25:17	1:4	8,56 <sup>G1</sup>	5,26 <sup>G2</sup>	1,80 <sup>G3</sup>	
<i>Idh-1</i>	$A_1A_2$	a	8	33:29	–	13,51	13,51	0,00	
	$A_2A_3$	a	2	10:8	–	0,40	0,18	0,22	
<i>Pgi-2</i>	$A_2A_3$	a	8	41:42	–	5,37	5,36	0,01	
<i>Pgm-1</i>	$A_1A_2$	a	4	17:22	–	3,80	3,16	0,64	
<i>Pgm-2</i>	$A_1A_2$	a	6	21:33	–	16,74*	14,07*	2,67	1
	$A_1A_2$	b	5	21:23	–	6,94	6,84	0,09	
<i>Skdh-1</i>	$A_1A_2$	a	1	2:6	–	–	–	0,14	

$N_{ij}$  e  $N_{ii} + N_{jj}$  são os números observados de genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

$N_{ik}$  e  $N_{jk}$  são os números observados de genótipos heterozigóticos do tipo  $ik$  e  $jk$ , respectivamente.

a) Inclui todas as árvores heterozigóticas em um dado loco.

b) Exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(\*)  $P < 0,05$ .

G1:  $GL = 2n$ ; G2:  $GL = 2(n-1)$ ; G3:  $GL = 2$ .

Em suma, com base nos resultados dos três testes de qui-quadrado, não foram detectados indícios fortes de desvios de segregação mendeliana em nenhum dos sete locos avaliados e, portanto, estes podem ser utilizados em estudos do sistema de reprodução, análise de paternidade e diversidade e estrutura genética de populações de *C. pachystachya*.

### 3.3 Desequilíbrio de Ligação

A estimativa da medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ) revelou valores baixos entre todas as possíveis combinações de pares de locos (máximo -0,039) e o

teste de qui-quadrado não detectou associações significativas em nenhum dos casos (TABELA 2). Isto indica que os alelos dos diferentes locos estão segregando independentemente, e os locos podem ser usados conjuntamente em estudos que requeiram locos em equilíbrio gamético (estudos do sistema de reprodução e análise de paternidade). A ausência de desequilíbrio de ligação em *C. pachystachya* pode, provavelmente, ser explicada pelo fato de tratar-se de espécie dióica. A reprodução obrigatória por cruzamentos favorece a recombinação entre locos, assim, não são esperadas fortes associações entre locos.

TABELA 2 – Valores da medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ), resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e probabilidade associada ( $P$ ) para pares de locos isoenzimáticos em *C. pachystachya*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$P$	Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$P$
<i>Acp2:G6pdh-1</i>	0,010	0,77	0,380	<i>Idh-1:Pgi-2</i>	-0,013	0,73	0,394
<i>Acp2:Idh-1</i>	0,011	0,76	0,384	<i>Idh-1:Pgm-1</i>	0,023	1,10	0,294
<i>Acp2:Pgi-2</i>	-0,008	0,74	0,461	<i>Idh-1:Pgm-2</i>	0,011	0,23	0,632
<i>Acp2:Pgm-1</i>	0,023	1,72	0,190	<i>Idh-1:Skdh-2</i>	-0,003	0,49	0,482
<i>Acp2:Pgm-2</i>	0,004	0,07	0,792	<i>Pgi-2:Pgm-1</i>	0,032	1,47	0,225
<i>Acp2:Skdh-2</i>	0,000	0,00	0,380	<i>Pgi-2:Pgm-2</i>	-0,010	1,05	0,305
<i>G6pdh-1:Idh-1</i>	-0,039	2,78	0,096	<i>Pgi-2:Skdh-2</i>	0,002	0,59	0,441
<i>G6pdh-1:Pgi-2</i>	-0,024	2,50	0,114	<i>Pgm-1:Pgm-2</i>	0,013	0,43	0,510
<i>G6pdh-1:Pgm-1</i>	0,020	0,35	0,556	<i>Pgm-1:Skdh-2</i>	0,003	0,79	0,374
<i>G6pdh-1:Pgm-2</i>	0,017	0,45	0,500	<i>Pgm-2:Skdh-2</i>	0,003	1,13	0,287
<i>G6pdh-1:Skdh-2</i>	0,001	0,02	0,898				

## 4 CONCLUSÕES

Todos os locos avaliados apresentaram herança mendeliana simples e nenhum dos pares de locos considerados parece estar em desequilíbrio de ligação, portanto os mesmos podem ser utilizados em subseqüentes estudos genéticos populacionais que requeiram o equilíbrio gamético entre locos (estudos do sistema de reprodução e análise de paternidade), como pressuposição básica.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto na forma de bolsa de estudos para o primeiro autor e financiamento do projeto; agradecem, também, aos três revisores anônimos pelas sugestões e correções feitas no prévio manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 71, p. 33-40, 1980.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 574 p.

BROWN, A. H. D.; ALLARD, R. W. Estimation of mating system in open-pollinated maize populations using isozymes polymorphisms. **Genetics**, Washington, D.C., v. 66, p. 133-145, 1970.

EL-KASSABY, Y. A.; YEH, F. C.; SZIKLAI, O. Inheritance of allozyme variants in Coastal Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 24, p. 325-335, 1982.

FALLOUR, D.; FADY, B.; LEFÈVRE, F. Evidence of variation in segregation patterns within a Cedrus population. **The J. of Heredity**, Cary, v. 92, p. 260-266, 2001.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.

HUANG, Q. Q. *et al.* Genetic control of isozyme variation in Masson Pine, *Pinus massoniana* Lamb. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 285-292, 1994.

KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. I. Inheritance of isozymes variants. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 25-37, 2001.

LEWANDOWSKI, A. Inheritance and linkage of some allozymes in *Pinus armandii* Franch. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 79-82, 2000.

\_\_\_\_\_.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance of allozymes in *Larix decidua* Mill. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 39, p. 184-188, 1990.

\_\_\_\_\_.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 342-347, 1992.

LIU, Z.; FURNIER, G. R. Inheritance and linkage of allozymes and restriction fragment length polymorphisms in Trembling Aspen. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 419-424, 1993.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 302 p.

MATHER, K. **The measurement of linkage in heredity**. New York: John Wiley & Sons, 1963. 149 p.

MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G. G.; GIANNINI, R. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Pinus leucodermis* Ant. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 231-236, 1993.

PASTORINO, M. J.; GALLO, L. A. Inheritance of isozymes variants in *Astrocedrus chilensis* (D. Do) Florin et Boutelje. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, p. 15-20, 1998.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Version 1.1. British Columbia: University of British Columbia. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.htm>>. Acesso em: 18 abr. 1998.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, p. 191-196, 2002.

THORSÉN, J. *et al.* Inheritance and linkage of isozyme loci in the Basket Willow (*Salix viminalis* L.). **The Journal of Heredity**, Cary, v. 88, p. 144-150, 1997.

WANG, C. T.; LIN, T. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme, and estimation of outcrossing rate in a seed orchard of *Cunninghamia konishii* Hay. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, p. 33-37, 1998.

WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.

\_\_\_\_\_.; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity**, Lund, v. 43, p. 105-111, 1979.

RIBAS, L. A.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em sete locos isoenzimáticos de *Cecropia pachystachya*.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32**: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. Edmonton: University of Alberta, 1999. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>>. Acesso em: 30 mar. 2004.

YING, L.; MORGENSTERN, E. K. Inheritance and linkage relationships of some isozymes of *Larix laricina* in New Brunswick, Canada. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 39, p. 245-251, 1990.

**PTERIDÓFITAS DO PARQUE ESTADUAL DE VASSUNUNGA,  
SANTA RITA DO PASSA QUATRO (SP), BRASIL.  
GLEBA PÉ-DE-GIGANTE<sup>1</sup>**

Áurea Maria Therezinha COLLI<sup>2</sup>  
Sonia Aparecida de SOUZA<sup>3</sup>  
Alexandre SALINO<sup>4</sup>  
André Luís Teixeira de LUCCA<sup>3</sup>  
Rogéria Toler da SILVA<sup>5</sup>

**RESUMO**

Neste trabalho foi realizado um levantamento de pteridófitas na Gleba Pé-de-Gigante do Parque Estadual de Vassununga, localizado no município de Santa Rita do Passa Quatro, sob as coordenadas 21°36'39,01054''S e 47°37'03,46727''W. As coletas foram realizadas em três trilhas, denominadas Trilha do Meliponário, Trilha do Córrego Paulicéia e Trilha da Torre. Foram reconhecidas 15 espécies de pteridófitas pertencentes a 7 famílias. Dessas, as mais representativas foram Polypodiaceae e Thelypteridaceae com quatro espécies cada, e Pteridaceae e Schizaeaceae que apresentaram duas espécies cada. Das 15 espécies registradas 9 apresentam distribuição bastante restrita, ocorrendo apenas na Trilha do Córrego Paulicéia. Por outro lado, *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) de la Sota, *Pleopeltis angusta* Willd e *Polypodium polypodioides* (L.) Watt são as espécies de ocorrência mais ampla. Em todas as trilhas há pteridófitas, sendo que a Trilha do Córrego Paulicéia é a mais rica, e a Trilha da Torre a mais pobre em número de espécies. As pteridófitas ocorrem no cerrado "sensu stricto", cerradão e na floresta de galeria. A maior diversidade de espécies foi encontrada na floresta de galeria.

**Palavras-chave:** Pteridophyta; floresta de galeria; cerrado "sensu stricto"; cerradão; Parque Estadual de Vassununga; flora; São Paulo.

**1 INTRODUÇÃO**

Segundo Tryon (1986) a região Sudeste do Brasil apresenta cerca de 600 espécies de pteridófitas. No Estado de São Paulo (cerca de 500 espécies, distribuídas em 25 famílias e aproximadamente 50 gêneros), a grande maioria das espécies de pteridófitas ocorre na mata atlântica

**ABSTRACT**

This work presents a pteridophytical survey carried out at the Gleba Pé-de-Gigante of the Vassununga State Park, in the municipality of Santa Rita do Passa Quatro (21°36'39.01054''S and 47°37'03.46727''W). Collections were accomplished at three trails called "Trilha do Meliponário, Trilha do Córrego Paulicéia and Trilha da Torre". Fifteen species of pteridophytes pertaining to 7 families were recognized. From these, the most representative ones were Polypodiaceae and Thelypteridaceae, with 4 species each, and Pteridaceae and Schizaeaceae, with two species each. From the 15 species registered, nine present a very restricted distribution occurring only in the "Trilha do Córrego Paulicéia", *Microgramma squamulosa*, *Pleopeltis angusta* and *Polypodium latipes* are the most abundant species. There are pteridophytes in all the trails. "Trilha do Córrego Paulicéia" was found to be the richest in species and the "Trilha da Torre" is the poorest. Pteridophytes occur in gallery forest, cerrado "sensu stricto" and "cerradão". The richest species diversity was found in the gallery forest.

**Key words:** Pteridophytes; gallery forest; cerrado "sensu stricto"; cerradão; Vassununga State Park; flora; São Paulo.

ao longo da Serra do Mar, nas matas da Serra da Mantiqueira e nas do Vale do Ribeira (Salino, 1993). A mata atlântica localizada nos planaltos do interior, denominada matas mesófilas semidecíduais de planalto e de encosta, e a mata atlântica localizada ao longo de cursos de água do interior do estado, denominada floresta de galeria, apresentam diversidade menor do que as citadas acima (Salino, 1993).

(1) Aceito para publicação em outubro de 2004.

(2) FAFIBE, FFCLSJRP, Rua João Mutarelli, 180, 14700-000, Porto Ferreira, SP, Brasil. E-mail: aureacolli@linkway.com.br

(3) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil.

(4) UFMG, Departamento de Botânica, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil.

(5) Unicapital, Rua Ibitetuba, 42/130, Moóca, 03127-180, São Paulo, SP, Brasil.

Apesar da baixa diversidade de espécies de pteridófitas existentes no interior do Estado de São Paulo, poucos estudos têm sido realizados sobre a flora pteridofítica, destacando-se os de Brade (1937, 1951), Pereira-Noronha (1989), Esteves & Melhem (1992), Windisch (1992), Simabukuro *et al.* (1994), Salino (1996), Prado (1998), Siqueira & Windisch (1998), Hirai & Prado (2000) e Prado & Labiak (2001).

O cerrado ocupa dois milhões de quilômetros quadrados, o que representa cerca de 23% do território brasileiro (Ratter *et al.*, 1992), sendo considerado o segundo maior bioma do país em área (Ribeiro & Walter *apud* Weiser & Godoy, 2001).

No Estado de São Paulo, esse tipo de vegetação ocupava 14% do território, dos quais resta hoje menos de 1% na forma de pequenos fragmentos (Weiser & Godoy, 2001).

Atualmente, o cerrado é considerado um complexo de formações oreádicas com fisionomias diferentes, desde o campo limpo (fisionomia campestre) até o cerradão (fisionomia florestal), representando as forma savânicas intermediárias (campo sujo, campo cerrado e cerrado “sensu stricto”) um longo ecótono entre aquelas duas fisionomias extremas (Coutinho *apud* Gomes *et al.*, 2004). As fisionomias extremas (o campo limpo e o campo cerrado) apresentariam espécies exclusivas, enquanto as fisionomias savânicas apresentariam uma mistura dessas espécies (Gomes *et al.*, 2004).

O presente estudo é uma contribuição ao conhecimento da flora pteridofítica das formações vegetais do interior do Estado de São Paulo, principalmente da Gleba Pé-de-Gigante do Parque Estadual de Vassununga.

As informações obtidas podem subsidiar outras pesquisas como por exemplo a fenologia de algumas espécies de pteridófitas, bem como atividades de Educação Ambiental.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O Parque Estadual de Vassununga é uma das Unidades de Conservação administrada pelo Instituto Florestal, localizado no município de Santa Rita do Passa Quatro, SP, sob as coordenadas geográficas, 21°43'S e 47°35'W.

Possui uma área de 2.045,06 ha distribuídos em seis glebas independentes: Capão da Várzea, Capetinga Oeste, Praxedes, Maravilha, Capetinga Leste e Pé-de-Gigante. A Gleba Pé-de-Gigante apresenta 1.212,92 ha (Korman, 2003).

O clima da região pode ser classificado, segundo Köppen (1948) como Cwag<sup>3</sup>, temperado macrotérmico, moderadamente chuvoso, de inverno seco não-rigoroso. A temperatura média anual é de 20,8°C. O período de chuvas vai de dezembro a fevereiro, com média de 254 mm e o de estiagem de junho a agosto, com média de 30,8 mm (Shida, 2000; Instituto Florestal *apud* Korman, 2003). Na região predominam rochas sedimentares mesozóicas, caracterizadas como pertencentes às formações Botucatu e Pirambóia e rochas intrusivas básicas tabulares. As altitudes variam entre 600 a 780 m (Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT *apud* Korman, 2003; Martins, 1979; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE *apud* Korman, 2003; Instituto Florestal, *apud* Korman, 2003).

A Gleba Pé-de-Gigante encontra-se entre as coordenadas 21°36'39,01054''S e 47°37'03,46727''W e altitude de 712,218 m (Levantamento Planimétrico 1:5000 das Glebas do PEV GPS).

A vegetação predominante na região é a savânica, como o campo cerrado, campo “sujo”, cerrado “sensu stricto”, florestais, como a floresta estacional semidecidual, floresta de galeria (ripária ou mata ciliar), além de campos úmidos (em áreas de várzeas) (Martins, 1979; Batalha, 1997).

Foram realizadas coletas das pteridófitas ao longo de três trilhas da Gleba Pé-de-Gigante: Trilha do Meliponário, Trilha do Córrego Paulicéia e Trilha da Torre.

A Trilha do Meliponário percola cerradão, a Trilha do Córrego Paulicéia percola cerradão e floresta de galeria e a Trilha da Torre percola somente cerrado “sensu stricto” (Rizzini *apud* Vieira *et al.*, 1989). A mata existente ao longo do Córrego da Paulicéia é tratada como floresta de galeria.

O material botânico coletado, prensado e herborizado segundo as técnicas usuais, foi incluído no acervo do Herbário do Instituto Florestal - SPSF. Algumas espécies de pteridófitas foram identificadas por comparação com o material depositado no Herbário do Instituto Florestal.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas 7 famílias, 10 gêneros e 15 espécies (TABELA 1). Com relação às famílias, Polypodiaceae e Thelypteridaceae apresentaram quatro espécies cada, Pteridaceae e Schizaeaceae apresentaram duas espécies cada e Cyatheaceae, Dryopteridaceae e Dennstaedtiaceae apresentaram uma espécie cada (FIGURA 1).

Apesar da diversidade de formações vegetais existentes nas diferentes localidades estudadas, as famílias mais representativas em número de espécies da Gleba Pé-de-Gigante do Parque Estadual de Vassununga também foram encontradas em outras áreas. Essas famílias mais representativas foram observadas na Serra da Juréia por Prado & Labiak (2001). A família de pteridófitas com representantes de hábito epífítico mais representativa na Gleba Pé-de-Gigante foi Polypodiaceae ocorrendo o mesmo na Reserva Volta Velha (SC) (Labiak & Prado, 1998). Quanto às famílias mais representativas, Salino (1996) encontrou resultados semelhantes no Morro do Cuscuzeiro, Analândia (SP), sendo estas: Pteridaceae, Polypodiaceae e Thelypteridaceae. No Parque Estadual do Rio Doce (MG) as famílias Pteridaceae e Thelypteridaceae também foram as mais representativas (Graçano *et al.*, 1998). No entanto, na Reserva Ecológica de Jangadina (PE) a família Pteridaceae foi a mais representativa (Ambrósio & Barros, 1997). Na região Norte, nos Estados do Amazonas e Pará e nos territórios do Acre e Rondônia, foi observado um grande número de espécies pertencentes à família Thelypteridaceae (Tryon & Conant, 1975). Assim, conclui-se que existem semelhanças florísticas, com relação às famílias de pteridófitas mais ricas em espécies, entre essas diferentes localidades.

A família Polypodiaceae ocorreu em todas as trilhas nos habitats de cerrado “sensu stricto”, cerradão e floresta de galeria, e Schizaeaceae ocorreu na Trilha do Meliponário e na Trilha do Córrego Paulicéia, nos habitats de floresta de galeria e cerradão; Blechnaceae, Cyatheaceae, Pteridaceae e Thelypteridaceae ocorreram na Trilha do Córrego Paulicéia no habitat de floresta de galeria e Dennstaedtiaceae ocorreu na Trilha do Meliponário no habitat de cerradão (TABELA 1).

Com relação à diversidade específica do grupo, sabe-se que as famílias Pteridaceae e Thelypteridaceae são de grande importância e representatividade nos trópicos (Tryon & Tryon, 1982), e na Gleba Pé-de-Gigante do Parque Estadual de Vassununga a família Thelypteridaceae foi uma das melhores representadas.

Na Gleba Pé-de-Gigante ocorrem as formações vegetais, cerrado “sensu stricto”, cerradão, brejo e floresta de galeria, e no Morro do Cuscuzeiro, florestas estacionais semidecíduais de encosta, cerrado “sensu stricto”, florestas ciliares, brejos permanentes e cerrados com afloramento de arenito. Apesar da existência de diferentes formações vegetais, os gêneros mais representativos nas glebas Pé-de-Gigante do Parque Estadual de Vassununga e no Morro do Cuscuzeiro, Analândia-SP, foram *Thelypteris* e *Anemia* (Salino, 1996).

*Polypodium latipes* foi a espécie que se apresentou em maior número de trilhas nos habitats de cerrado “sensu stricto”, cerradão e floresta de galeria. *Microgramma squamulosa* e *Pleopeltis angusta* ocorreram na Trilha do Meliponário e na Trilha do Córrego Paulicéia nos dois habitats. Das 15 espécies registradas, nove apresentam distribuição bastante restrita, ocorrendo somente na Trilha do Córrego Paulicéia e observou-se apenas uma espécie na Trilha da Torre (TABELA 1).

Segundo Prado (1998), na região central do Estado de São Paulo, onde está localizado o município de Santa Rita do Passa Quatro, as pteridófitas ocorrem nas regiões serranas, florestas de galerias, remanescentes de matas mesófilas, remanescentes de matas semidecíduas e nas regiões de cerrado, o que pôde ser constatado no presente estudo (TABELA 1).

A maioria das espécies de pteridófitas (12) ocorreu em locais úmidos, na floresta de galeria, das quais nove são terrestres, duas epífitas e uma é tanto terrestre como epífita. *Pteridium* sp. e *Anemia villosa* ocorreram apenas na Trilha do Meliponário, no habitat de cerradão (TABELA 1). Ranal (1995) verificou que as espécies de pteridófitas terrestres, *Polypodium latipes*, *Adiantopsis radiata* e *Pteris denticulata*, sendo que as duas últimas não foram observadas neste estudo, ocorreram em solos que retêm maior quantidade de água, mantendo seus rizomas e raízes na camada superficial do substrato, onde há maior umidade em relação às partes mais profundas.

TABELA 1 – Espécies de pteridófitas na Gleba Pé-de-Gigante do Parque Estadual de Vassununga, (21°36'39,01054''S e 47°37'03,46727''W). Hábito: TE = terrestre, EP = epífita. Habitat: CE = cerradão, CES = cerrado "sensu stricto", FG = floresta de galeria. Local de Ocorrência: TM = Trilha do Meliponário, TCP = Trilha do Córrego Paulicéia, TT = Trilha da Torre.

Família Espécie	Hábito	Habitat	Local de Ocorrência
<b>BLECHNACEAE</b>			
<i>Blechnum brasiliense</i> Desv.	TE	FG	TCP
<b>CYATHEACEAE</b>			
<i>Cyathea delgadii</i> Sternb.	TE	FG	TCP
<b>DENNSTAEDTIACEAE</b>			
<i>Pteridium</i> sp.	TE	CE	TM
<b>POLYPODIACEAE</b>			
<i>Microgramma squamulosa</i> (Kaulf.) de la Sota	EP	CE, FG	TM, TCP
<i>Pleopeltis angusta</i> Willd.	EP	CE, FG	TM, TCP
<i>Polypodium polypodioides</i> (L.) Watt.	EP	CE	TM
<i>Polypodium latipes</i> Langsd. & Fisch.	EP, TE	CE, FG, CES	TM, TCP, TT
<b>PTERIDACEAE</b>			
<i>Adiantum diogoanum</i> Glaziou ex Baker	TE	FG	TCP
<i>Cheilantes concolor</i> Langsd. & Fisch.	TE	FG	TCP
<b>SCHIZAEACEAE</b>			
<i>Anemia phyllitidis</i> (L.) Sw.	TE	FG	TCP
<i>Anemia villosa</i> H.B. & Willd.	TE	CE	TM
<b>THELYPTERIDACEAE</b>			
<i>Thelypteris dentata</i> (Forssk.) E. St. John	TE	FG	TCP
<i>Thelypteris hispidula</i> (Decne.) C. F. Reed	TE	FG	TCP
<i>Thelypteris rivularioides</i> (Fée) Abbiatti	TE	FG	TCP
<i>Thelypteris salzmännii</i> (Fée) Morton	TE	FG	TCP

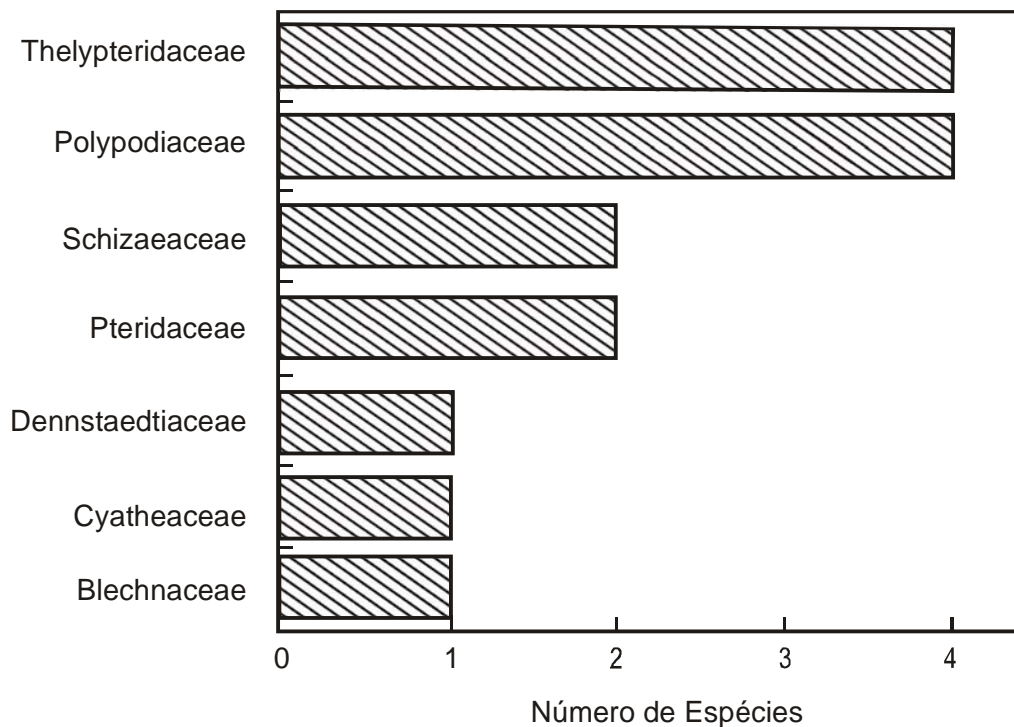


FIGURA 1 – Distribuição do número de espécies de pteridófitas pelas respectivas famílias da Gleba Pé-de-Gigante do Parque Estadual de Vassununga-SP.

A maioria das espécies de hábito epífítico (*Microgramma squamulosa*, *Pleopeltis angusta*, *Polypodium polypodioides* e *P. latipes*, que apresentou hábito terrestre e epífítico) ocorreu na Trilha do Meliponário e na Trilha do Córrego Paulicéia, no cerradão e na floresta de galeria. A espécie *P. latipes* ocorreu também na Trilha da Torre, no habitat de cerrado “sensu stricto”. Observou-se a presença de escassos números de espécies de pteridófitas com hábito epífítico no Parque. Segundo Fontoura *et al.* *apud* Graçano *et al.* (1998), áreas de mata secundária apresentam um reduzido número de epífitas em relação às áreas de mata primária. Neste caso, a escassez de espécies epífitas pode ser um indicativo do caráter secundário da mata da Gleba Pé-de-Gigante do Parque Estadual de Vassununga.

Das 15 espécies de pteridófitas que ocorrem na Gleba Pé-de-Gigante nos ambientes de matas ou associadas a elas, 11 também foram registradas por Salino (1993) em três remanescentes florestais da bacia do rio Jacaré-Pepira nos municípios de Itirapina e Brotas – SP, e nove espécies foram registradas por Simabukuro *et al.* (1994) na floresta de galeria da Reserva Biológica de Moji-Guaçu-SP.

Prado & Labiak (2001) encontraram quatro dessas espécies ocorrentes na região, compartilhadas com o presente estudo, em floresta pluvial tropical da Serra da Juréia, e Pietrobon & Barros (2002) registraram a presença da espécie *Adiantum dioganum*, encontrada no presente estudo, em remanescente de floresta atlântica no Estado de Pernambuco. Já, Colli *et al.* (2003) encontraram 11 dessas espécies nas regiões de mata do Parque Estadual de Porto Ferreira – SP. A presença das mesmas espécies de pteridófitas nessas diferentes localidades é um indicativo de que quanto mais próxima a região comparada maior é a semelhança florística, ocorrendo apenas uma espécie comum no Estado de Pernambuco.

Com relação ao habitat de cerrado, tem-se que das 6 espécies de pteridófitas que ocorrem na Gleba Pé-de-Gigante neste habitat, cinco também foram registradas por Salino (1996) no cerrado do Morro do Cuscuzeiro em Analândia-SP e três foram registradas por Esteves & Melhem (1992) nos cerrados da Reserva Biológica de Moji-Guaçu-SP. Colli *et al.* (2003) também encontraram sete dessas espécies no cerrado, do Parque Estadual de Porto Ferreira-SP.

Já, Batalha & Mantovani (2001) ao realizarem levantamento florístico na área de cerrado da Gleba Pé-de-Gigante, do Parque Estadual de Vassununga, encontraram apenas uma espécie de pteridófita em comum. Uma possível explicação para a ausência das outras espécies de pteridófitas é o seu consumo por animais ou a sua extinção por algum outro fator ambiental, como o vento ou chuvas torrenciais que ocorreram, principalmente, nos meses de verão.

#### 4 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Florestal pelo fornecimento das condições necessárias para a realização deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBRÓSIO, S. A.; BARROS, I. C. I. Pteridófitas de uma área remanescente de Floresta Atlântica do Estado de Pernambuco. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 105-113, 1997.
- BATALHA, M. A. **Análise da vegetação da ARIE cerrado Pé-de-Gigante (Santa Rita do Passa Quatro, SP)**. 1997. 185 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- \_\_\_\_\_.; MANTOVANI, W. Floristic composition of the cerradão in the Pé-de-Gigante reserve (Santa Rita do Passa Quatro, Southeastern Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, DF, v. 15, n. 3, p. 289-304, 2001.
- BRADE, A. C. Pteridophytas coletadas em Campos do Jordão, em 1937 pelo Dr. Campos Porto e determinadas por A. C. Brade. **Rodriguésia**, São José do Rio Preto, v. 9, p. 113-116, 1937.
- \_\_\_\_\_. Relatório da excursão à Serra da Bocaina, no estado de São Paulo, realizada pelo naturalista A. C. Brade, de 18 de abril à 24 de maio de 1951. **Rodriguésia**, São José do Rio Preto, v. 26, p. 55-66, 1951.
- COLLI, A. M. T.; SOUZA, S. A. de; SILVA, R. T. da. Pteridófitas do Parque Estadual de Porto Ferreira (SP), Brasil. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 29-36, 2003.
- ESTEVES, L. M.; MELHEM, T. S. Morfologia de esporos de pteridófitas do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu (SP). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 73-83, 1992.
- GOMES, B. Z.; MARTINS, F. R.; TAMASHIRO, J. Y. Estrutura do cerradão e da transição entre cerradão e floresta paludícola num fragmento da International Paper do Brasil Ltda., em Brotas, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 249-262, 2004.
- GRAÇANO, D.; PRADO, J.; AZEVEDO, A. A. Levantamento preliminar de Pteridophyta do Parque Estadual do Rio Doce (MG). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 165-182, 1998.
- HIRAI, R. Y.; PRADO, J. Selaginellaceae Willk. no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 313-339, 2000.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 478 p.
- KORMAN, V. **Proposta de interligação das glebas do Parque Estadual de Vassununga (Santa Rita do Passa Quatro, SP)**. 2003. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo Piracicaba.
- LABIAK, P. H.; PRADO, J. Pteridófitas epífitas da Reserva Volta Velha, Itapoá – Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 11, p. 1-79, 1998.
- MARTINS, F. R. **O método de quadrantes e a fitossociologia de uma floresta residual do interior do Estado de São Paulo: Parque Estadual de Vassununga**. 1979. 238 f. Tese (Doutorado em Botânica), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PEREIRA-NORONHA, M. R. **Formas de vida e reprodução em pteridófitas**. 1989. 272 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.
- PIETROBOM, M. R.; BARROS, I. C. L. Pteridófitas de um remanescente de Floresta Atlântica em São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, DF, v. 16, n. 4, p. 457-479, 2002.

COLLI, A. M. T. *et al.* Pteridófitas do Parque Estadual de Vassununga, Santa Rita do Passa Quatro (SP), Brasil. Gleba Pé-de-Gigante.

PRADO, J. Pteridófitas do Estado de São Paulo. In: BICUDO, C. E. de M.; SHEPHERD, G. J. (Ed.). **Fungos macroscópicos e plantas do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, 1998. cap. 5, p. 49-61. (Série Biodiversidade do Estado de São Paulo, v. 2).

\_\_\_\_\_.; LABIAK, P. H. Lista de pteridófitas da Serra da Juréia, município de Iguape, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 15, p. 83-85, 2001.

RANAL, M. A. Estabelecimento de pteridófitas em mata mesófila semidecídua do Estado de São Paulo. 2. Natureza dos Substratos. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 583-594, 1995.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, p. 223-230, 1992.

SALINO, A. **Flora pteridofítica das matas ciliares da bacia do rio Jacaré-Pepira, estado de São Paulo, Brasil**. 1993. 277 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

\_\_\_\_\_. Levantamento das pteridófitas da Serra do Cuscuzeiro, Analândia, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-178, 1996.

SHIDA, C. N. **Levantamento da distribuição espacial e temporal dos elementos da paisagem e seus determinantes, na região dos municípios de Luiz Antônio e Santa Rita do Passa Quatro (SP), como subsídio ao planejamento ambiental**. 2000. 114 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SIMABUKURO, E. A.; ESTEVES, L. M.; FELIPPE, G. M. Fotoblastismo de pteridófitas de mata ciliar. **Insula**, Florianópolis, n. 22, p. 177-186, 1994.

SIQUEIRA, C. R.; WINDISCH, P. G. Pteridófitas da Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil: Dennstaedtiaceae. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 357-365, 1998, Suplemento.

TRYON, R. Biogeography of species, with special reference to ferns. **Botanical Review**, New York, v. 52, n. 2, p. 117-156, 1986.

TRYON, R. M.; CONANT, D. S. The ferns of Brazilian Amazonia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 5, n. 1, p. 23-34, 1975.

\_\_\_\_\_.; TRYON, A. F. **Ferns and allied plants, with special reference to Tropical America**. New York: Spring Verlag, 1982. 300 p.

VIEIRA, M. G. L. *et al.* Composição florística e estrutura fitossociológica da vegetação arbórea do Parque Estadual de Vaçununga, Santa Rita do Passa Quatro (SP). II – Gleba Capetinga Oeste. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 135-159, 1989.

WEISER, V. L.; GODOY, S. A. P. Florística em um hectare de cerrado stricto sensu na ARIE – Cerrado Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, DF, v. 15, n. 2, p. 201-212, 2001.

WINDISCH, P. G. **Pteridófitas da região norte-ocidental do Estado de São Paulo: guia para estudo e excursões**. 2. ed. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 1992. 200 p.

# HERANÇA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM LOCOS ISOENZIMÁTICOS DE *Eschweilera ovata*\*

Eduardo GUSSON\*\*  
Alexandre Magno SEBBENN\*\*\*

## RESUMO

A herança e o desequilíbrio de ligação entre 11 locos polimórficos de oito sistemas isoenzimáticos foram estudados em progênies de polinização aberta de duas populações de *Eschweilera ovata* (Bambess.) Miers (biriba) do Estado da Bahia. A análise da segregação de progênies de árvores heterozigotas revelou simples herança mendeliana para onze locos (*Acp-1*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Dia-3*, *G6pdh-1*, *Mdh-1*, *Nadh-1*, *Nadh-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2* e *6pgdh-1*). A segregação desses locos foi geralmente homogênea entre árvores, embora algumas tenham apresentado desvios significativos da segregação esperada 1:1. Desvios significativos do equilíbrio gamético foram detectados entre três pares de locos: *6pgdh-1:Pgi-2*, *Dia-1:Dia-2* e *Dia-2:Dia-3*.

Palavras-chave: segregação; desequilíbrio de ligação; isoenzimas; biriba; espécies arbóreas tropicais.

## 1 INTRODUÇÃO

Em décadas recentes, variantes eletroforéticas de isoenzimas têm-se tornado marcadores genéticos muito populares em pesquisas de genética florestal (Wang & Lin, 1998; Lewandowski, 2000; Marchelli & Gallo, 2000). Isoenzimas têm sido utilizadas para o mapeamento genômico, quantificação da diversidade e diferenciação genética de populações, análise do sistema de reprodução, estudos de introgressão e relação filogenética entre espécies (Lewandowski, 2000). Contudo, para estes fins, marcadores bioquímicos devem primeiro ter sua herança genética confirmada para utilização como marcadores genéticos (Pastorino & Gallo, 1998; Wang & Lin, 1998; Marchelli & Gallo, 2000). Estudos de herança mendeliana em isoenzimas têm sido conduzidos para inúmeras espécies arbóreas, especialmente em coníferas (Papageorgiou *et al.*, 1993;

## ABSTRACT

Inheritance and gametic disequilibrium were studied between 11 polymorphic loci of the eight isozymes systems from open-pollinated families of two *Eschweilera ovata* (Bambess.) Miers (biriba) populations from Bahia State. Segregation analysis of families from heterozygote trees revealed simple mendelian inheritance for eleven loci (*Acp-1*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Dia-3*, *G6pdh-1*, *Mdh-1*, *Nadh-1*, *Nadh-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2* and *6pgdh-1*). Gene segregation at these loci was generally homogeneous among trees. However, there were significant deviations from the expected segregations ratio 1:1 at some individual trees. Significant gametic disequilibrium was observed for three pairs of loci: *6pgdh-1:Pgi-2*, *Dia-1:Dia-2* and *Dia-2:Dia-3*.

Key words: segregation; linkage disequilibrium; isozymes; biriba; tropical tree species.

Pastorino & Gallo, 1998; Lewandowski, 2000). Espécies arbóreas tropicais têm sido objeto de menor número de estudos, embora o interesse por estas espécies, na análise do sistema de reprodução e estrutura genética, tenha aumentado na última década.

Aqui é reportado o estudo da herança e desequilíbrio de ligação entre locos isoenzimáticos de *E. ovata* (Lecythidaceae) ou biriba, uma espécie arbórea tropical de valor econômico que habita, exclusivamente, as florestas pluvial Atlântica e Amazônica brasileira. O objetivo é investigar se os marcadores bioquímicos revelados têm herança mendeliana simples e se existe desequilíbrio de ligação entre alelos de 11 locos isoenzimáticos revelados em *E. ovata*, para fins de utilização em estudos do sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética. Como não foram realizados cruzamentos controlados, a análise genética é baseada na segregação de progênies de polinização aberta de árvores maternas heterozigotas.

(\*) Aceito para a publicação em outubro de 2004.

(\*\*) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 15, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

(\*\*\*) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

Sementes de polinização aberta foram coletadas em 40 árvores de duas populações de *E. ovata* na região de Salvador, Estado da Bahia. Essas sementes foram posteriormente germinadas em incubadora, sob controle de luz e temperatura. Essas condições consistiram de fotoperíodo de oito horas em temperatura alternando de 25 a 30°C. As isoenzimas foram reveladas em tecidos foliares de plântulas com 20 a 25 dias de idade.

### 2.2 Eletroforese de Isoenzimas

A eletroforese horizontal em gel de amido foi usada para separar as enzimas ACP, DIA, G6PDH, IDH, MDH, PGI, 6PGDH, NADHDH e SKDH (TABELA 1).

As enzimas foram extraídas empregando-se, aproximadamente, 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP 40), 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP-60) e 200 microlitros da solução de extração número 1 de Alfenas (1998), alterada pela ausência de Mercaptoetanol. Utilizou-se a eletroforese horizontal conduzida em meio suporte de gel de 2/3 de amido de milho (penetrose 30) a 13%, combinado com 1/3 de amido de batata (Sigma). As “corridas” foram realizadas em geladeira com temperatura de 5°C.

A zona especificando bandas de maior taxa de migração foi designada como 1, a próxima 2 e assim, sucessivamente. Dentro de cada zona, a banda de migração mais rápida foi designada como 1, a próxima como 2 e assim sucessivamente.

TABELA 1 – Sistemas enzimáticos investigados para herança em *E. ovata*.

Sistemas enzimáticos (Abreviações) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados
Fosfatase ácida (ACP) 3.1.3.2	1	2
Diaforase (DIA) 1.8.1.4	1	3
	2	3
	3	3
Glucose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) 1.1.1.49	1	2
Isocitrato desidrogenase (IDH) 1.1.1.42	1	1
Malato desidrogenase (MDH) 1.1.1.37	1	3
	2	2
NADH-desidrogenase (NADH) 1.6.99.3	1	2
	2	3
Fosfogluose isomerase (PGI) 5.3.1.9	1	3
	2	4
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) 1.1.1.44	1	3
Xiquimato desidrogenase (SKDH) 1.1.1.25	1	2

### 2.3 Análise de Segregação

Neste trabalho não foram realizados cruzamentos controlados para o estudo da herança isoenzimática de *E. ovata*, adotando-se o método descrito por Gillet & Hattemer (1989) que compara árvores maternas heterozigotas com suas progênies de polinização aberta. As pressuposições do modelo de Gillet & Hattemer (1989) são que toda a progênie de uma árvore materna  $A_iA_i$  deve

possuir o alelo  $A_i$  da árvore mãe. Em caso de uma árvore mãe heterozigota (ex.  $A_iA_j$ ,  $i \neq j$ ) procedeu-se da seguinte maneira: a) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna,  $A_i$ ,  $A_j$ ; b) o número de progênies heterozigotas  $A_iA_j$  ( $N_{ij}$ ) deve ser igual a soma das progênies homozigotas  $A_iA_i$  ( $N_{ii}$ ) e  $A_jA_j$  ( $N_{jj}$ ),  $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ , e c) o número de progênies heterozigotas  $A_iA_k$  ( $N_{ik}$ ) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas  $A_jA_k$  ( $N_{jk}$ ),  $N_{ik} = N_{jk}$  ( $k \neq i, j$ ).

A análise genética foi realizada com 40 progênies, cada uma com dez plantas de polinização aberta. Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1, usando um teste  $G$  (Sokal & Rohlf, 1981) com um grau de liberdade. Posteriormente, todos os testes individuais foram somados e um teste  $G$  total foi obtido ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ), com  $n$  graus de liberdade, sendo  $n$  o número de progênies usadas no teste. Simultaneamente, os fenótipos observados foram somados e um teste de  $G$  agrupado para a segregação 1:1 foi obtido ( $G_{1:1Agrupado}$ ), com um grau de liberdade. A hipótese nula desse teste é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de genótipo heterozigoto. Em seguida, testou-se a hipótese de heterogeneidade de segregação entre progênies, usando-se um teste  $G$  de heterogeneidade ( $\sum G_{Heterogeneidade}$ ), obtido pela subtração do teste  $G$  agrupado ( $G_{1:1Agrupado}$ ), do teste  $G$  total ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ). Esses testes são aditivos de forma que  $\sum G_{Hipótese1:1} = \sum G_{Heterogeneidade} + G_{1:1Agrupado}$ , com  $n$ ,  $n-1$  e  $1$  grau de liberdade, respectivamente (Sousa *et al.*, 2002).

#### 2.4 Análise de Desequilíbrio de Ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\Delta_{ij}$ , Weir, 1979) e no coeficiente de correlação,  $r_{ij}$ , calculado de  $\Delta_{ij}$  (Weir, 1979), devido à possibilidade dos cruzamentos não terem ocorrido de forma aleatória e, conseqüentemente, existir endogamia nas progênies. Essa medida é aquela apropriada para situações onde a união de gametas não ocorreu de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir & Cockerham, 1979). O teste de desequilíbrio foi realizado usando o programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). A hipótese  $H_0: \Delta_{ij} = 0$  foi avaliada com o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) proposto por Weir (1979).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Herança e Padrão das Isoenzimas

Oito das 28 enzimas testadas em *E. ovata* puderam ser resolvidas suficientemente para o estudo da herança. A enzima Isocitrato desidrogenase (IDH) apresentou uma simples zona invariável, interpretada como um loco (*Idh-1*) monomórfico. A herança e os padrões de segregação das demais isoenzimas reveladas em *E. ovata* são descritos a seguir.

##### a) Fosfatase ácida (ACP)

O sistema ACP apresentou duas zonas de atividades. A zona de migração mais rápida (*Acp-2*) apresentou baixa qualidade de resolução e, por isso, foi descartada da análise genética. A zona de migração mais lenta, denominada *Acp-1*, foi interpretada como uma enzima de expressão monomérica, visto que a observação de genótipos heterozigotos nos zimogramas revelava duas bandas (FIGURA 1).

##### b) Diaforase (DIA)

O sistema DIA apresentou três zonas de atividade (*Dia-1*, *Dia-2* e *Dia-3*) (FIGURA 1). Essas zonas foram interpretadas como locos polimórficos de expressões monoméricas, segregando três alelos em cada loco (FIGURA 1). Três zonas de atividade também foram observadas nessa enzima em *Liriodendron tulipifera* L. (Parks *et al.*, 1990).

##### c) Glucose 6 Fosfato Desidrogenase (G6PDH)

Uma simples zona de atividade (*G6pdh-1*) foi observada na enzima G6PDH. Esse loco foi interpretado como polimórfico, segregando dois alelos (FIGURA 1). Um simples loco controlando essa enzima também foi relatado em *Pinus thunbergii* Parl (Shiraishi, 1988), *Pinus leucodermis* Ant. (Morgante *et al.*, 1993) e *Pinus massoniana* Lamb (Huang *et al.*, 1994). Observando os zimogramas nos géis de indivíduos heterozigotos, verificou-se que o fenótipo isoenzimático apresentava duas bandas, típico de enzimas monoméricas.

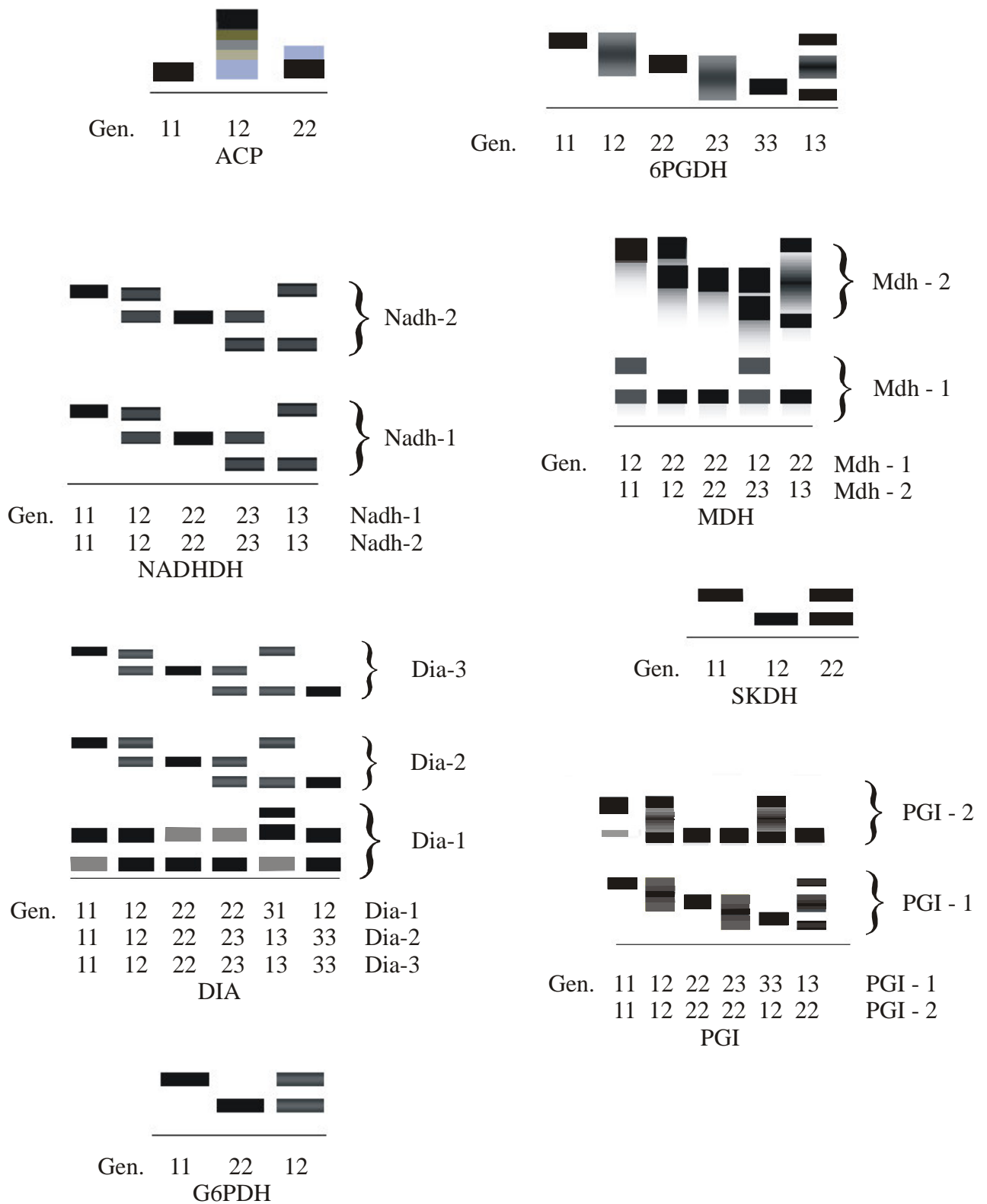


FIGURA 1 – Representação esquemática da interpretação de bandas dos sistemas enzimáticos analisados para *E. ovata*.

d) *Malato Desidrogenase* (MDH)

Duas zonas de atividade foram observadas no sistema MDH, sendo ambas polimórficas e interpretadas como locos (*Mdh-1* e *Mdh-2*), compostos por enzimas de expressão monomérica, segregando dois alelos na zona de migração mais lenta (*Mdh-1*) e três alelos na zona mais rápida (FIGURA 1). Duas zonas de atividade na enzima MDH também foi reportado em *Cunninghamia lanceolata* Hook. (Geburek & Wang, 1990), embora em *Thuja occidentalis* L. (Perry & Knowles, 1989), *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. (Chaisurisri & El-Kassaby, 1993) e *Acer pseudoplatanus* L. (Konnert *et al.*, 2001) tenham sido observadas três zonas de atividade.

e) *NADH-desidrogenase* (NADHDH)

Foram observadas duas zonas de atividade na enzima NADHDH (*Nadh-1* e *Nadh-2*), sendo ambas passíveis de interpretação (FIGURA 1). Em ambos os locos foram detectados a segregação de três alelos. O fenótipo de indivíduos heterozigotos apontou essa enzima como sendo monomérica.

f) *Fosfogluose Isomerase* (PGI)

Duas zonas de atividades foram observadas na enzima PGI (FIGURA 1). Em ambas as zonas, o fenótipo de indivíduos heterozigotos apresentou três bandas, o que é típico de enzimas diméricas. A zona de migração mais rápida (anódica), denominada *Pgi-1*, revelou a segregação de três alelos, e a zona mais lenta (*Pgi-2*) revelou a segregação de quatro alelos. A grande maioria dos estudos tem detectado duas zonas de atividade nessa enzima (Lewandowski *et al.*, 1992; Papageorgiou *et al.*, 1993; Wang & Lin, 1998; Lewandowski, 2000).

g) *Xiquimato Desidrogenase* (SKDH)

O sistema SKDH apresentou apenas uma zona de atividade (*Skdh-1*) nos géis. Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico, composto por uma enzima de expressão monomérica, com genótipo heterozigoto apresentando duas bandas e segregando dois alelos (FIGURA 1). Expressão monomérica no sistema SKDH também foi observada em *A. angustifolia* (Sousa *et al.*, 2002). Dois locos no sistema SKDH têm sido detectados em diversos outros estudos da herança isoenzimática em espécies arbóreas (Geburek & Wang, 1990; Potenko, 2001; Sousa *et al.*, 2002), embora existam relatos de apenas uma zona de atividade (Liu & Furnier, 1993).

h) *Fosfogluconato Desidrogenase* (6-PGDH)

Uma simples zona (*6pgh-1*) foi detectada na enzima 6PGDH. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos indica que essa enzima tem expressão dimérica e segrega três alelos (FIGURA 1). Um simples loco no sistema 6PGDH também foi relatado em *P. taeda* (Adams & Joly, 1980), embora em muitos estudos dois locos tenham sido reportados nessa enzima (Cheliak & Pitel, 1985; Potenko, 2001; Sousa *et al.*, 2002).

## 3.2 Segregação

O loco *Idh-1* era monomórfico e o *Mdh-2* não apresentou nenhum genótipo materno heterozigoto, assim não foi possível estudar seus padrões de segregação. A análise genética de progênies de árvores heterozigotas de três (*Dia-2*, *Mdh-1* e *Nadh-2*) dos 11 locos polimórficos restantes e passíveis de análise não rejeitou a hipótese de segregação 1:1 (TABELA 2). Nos locos *Acp-3*, *Dia-1*, *Dia-3*, *G6pdh-1* e *Nadh-1* foram detectados desvios de segregação em pelo menos um dos três testes *G*, mas ausência de desvios quando progênies, mostrando desvios, foram excluídas das análises. O mesmo ocorreu em progênies de árvores heterozigotas do tipo  $A_2A_3$  do loco *Pgi-1* e de árvores  $A_1A_3$  no loco *Pgi-2*, sendo encontrados desvios significativos em dois dos três testes *G*, mas ausência de desvios quando as árvores, mostrando desvios significativos, foram excluídas da análise. O loco *6pghd-1* apresentou desvios significativos no teste agrupado ( $G_{1:1Agrupado}$ ), em progênies de árvores heterozigotas do tipo  $A_1A_2$  e no teste total de segregação ( $\sum G_{Hipótese 1:1}$ ) e teste agrupado ( $G_{1:1Agrupado}$ ), em progênies de árvores heterozigotas do tipo  $A_1A_3$ , mas ausência de desvios quando as árvores, mostrando desvios significativos, foram excluídas da análise. Assim, não se rejeita a hipótese de segregação 1:1 para esse loco.

Em suma, não existem indícios para rejeitar a hipótese esperada da segregação 1:1 em nenhum dos locos aqui estudados em *E. ovata*, e todos podem ser utilizados em estudos genéticos populacionais, sistema de reprodução e análise de paternidade com a espécie.

TABELA 2 – Testes G para hipótese de segregação regular de marcadores isoenzimáticos em *E. ovata*.

Loco	Genótipo materno	Caso	Número de árvores (n)	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$	$\sum G_{Hipótese I}$ GL = n	$\sum G_{Heterogeneidade}$ GL = n-1	$G_{I, Agrupado}$ GL = 1	Árvores com desvios de segregação
Acp-3	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	22	89:122	–	38,11**	32,92	5,18*	6
	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	b	16	73:74	–	11,36	11,26	0,10	
Dia-1	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	23	139:86	–	46,95**	34,35*	12,60**	4
	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	b	19	110:75	–	13,3	10,90	3,22	
Dia-2	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	9	37:43	–	14,10	12,91	1,19	1
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	a†	10	40:40	3:3	12,95	12,95	0,00	1
Dia-3	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	4	8:26	–	19,74**	9,71*	10,03**	2
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	b	2	7:10	–	2,20	1,67	0,53	
Gópdh-1	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	10	37:44	–	13,08	12,47	0,61	1
	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	b	9	36:37	–	2,96	2,20	0,76	
Mdh-1	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	22	83:125	–	44,22**	35,68**	8,54**	7
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	b	20	81:108	–	18,99	18,37	0,62	
Nadh-1	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	2	7:5	–	0,45	0,12	0,33	
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	a†	12	65:53	1:0	12,94	11,71	1,22	
Nadh-2	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	8	18:37	–	29,39**	21,45**	7,82*	1
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	b	7	17:29	–	6,19	4,93	1,26	
Pgi-1	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	18	79:88	–	24,51	24,28	0,23	
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	a	4	18:21	–	0,51	0,28	0,23	
Pgi-2	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a†	21	80:100	11:13	44,92*	44,76*	0,17	4
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	b†	17	70:78	10:7	37,34	36,95	0,39	
pghd-1	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	a	17	86:73	–	18,62	17,55	1,06	3
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	a†	5	27:5	12:0	26,99**	10,35*	16,64**	
	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	b†	2	12:5	7:0	7,58	3,42	4,16	4
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	a	14	40:76	–	23,23	11,87	11,36**	
	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	b	13	39:68	–	11,85	9,45	2,40	4
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	a†	12	38:43	24:12	48,96**	46,85**	4,08	1
	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	b†	11	38:39	23:7	26,33	25,65	5,01	
	A <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	a†	5	12:25	4:5	16,98	12,30	0,11	1

$N_{ij}$  e  $N_{ii} + N_{jj}$  são os números observados dos genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

$N_{ik}$  e  $N_{jk}$  são os números observados de genótipos heterozigotos do tipo  $ik$  e  $jk$ , respectivamente.

a) Inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco.

b) Exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(\*)  $P < 0,050$ .

(\*\*)  $P < 0,010$ .

† = 2 x GL.

### 3.3 Desequilíbrio de Ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado usando apenas os onze locos polimórficos, com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows. Foram detectados fracos indícios de desequilíbrio de ligação nos locos avaliados em *E. ovata*. São apresentados na TABELA 3 apenas os resultados para os locos com desvios significativos, visando economizar espaço. Dos 55 pares possíveis de combinação de locos, apenas três pares (*6pgdh-1:Pgi-2*; *Dia-1:Dia-2* e *Dia-2:Dia-3*) apresentaram desvios significativos a 95% de probabilidade da hipótese de segregação independente ou equilíbrio de ligação. Isso representa 5,4% dos pares de locos possíveis de comparação. Nos demais pares de locos não foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação, e é possível afirmar que os alelos de diferentes locos não estão associados e segregam independentemente.

Em relação aos locos com desequilíbrio de ligação, ressalta-se que, embora os desvios são significativos, as ligações são aparentemente fracas, como pode ser observado pelos baixos valores de  $\hat{\Delta}_{ij}$  (TABELA 3). A exclusão de um dos locos dos pares *6pgdh-1:Pgi-2*; *Dia-1:Dia-2* e *Dia-2:Dia-3*, quebra qualquer associação alélica entre esses, de forma que possam ser usados em subseqüentes análises do sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética de populações de *E. ovata*.

O desequilíbrio de ligação entre os pares de locos aqui detectados não foi reportado até o presente, em nenhum outro estudo com espécies arbóreas. Como a utilização de locos em desequilíbrio de ligação no estudo do sistema de reprodução e estrutura genética produz estimativas não independentes de parâmetros genéticos, um loco de cada par ligado deverá preferencialmente ser excluído das futuras análises.

TABELA 3 – Valores da medida composta de Burrows para o desequilíbrio de ligação ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ), resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e probabilidade associada ( $P$ ) para pares de locos isoenzimáticos que apresentaram desvios significativos da hipótese de desequilíbrio de ligação em *E. ovata*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	$P$
<i>6pgdh-1:Pgi-2</i>	-0,029	4,61*	0,032
<i>Dia-1:Dia-2</i>	-0,042	5,39*	0,020
<i>Dia-2:Dia-3</i>	0,028	3,92*	0,048

(\*)  $P < 0,05$ .

### 4 CONCLUSÕES

Não foram detectados desvios significativos de segregação nos onze locos analisados, podendo-se aceitar que se encontram sob controle genético e segregam de acordo com a razão 1:1.

Foram detectados desvios significativos da hipótese de equilíbrio de ligação entre os pares de locos *6pgdh-1:Pgi-2*; *Dia-1:Dia-2* e *Dia-2:Dia-3*. Um loco de cada par deve, preferencialmente, ser excluído das análises genéticas que requerem locos em equilíbrio de ligação.

### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa parcial de mestrado ao primeiro autor; à Fundação de Amparo

à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento da pesquisa; à Assistente Técnica de Pesquisa Científica e Tecnológica Yara Cristina Marcondes e ao Técnico de Apoio à Pesquisa Carlos Eduardo Spósito, pela revisão gramatical e correção do presente artigo, respectivamente.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 71, p. 33-40, 1980.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 574 p.

- CHAISURISRI, K.; EL-KASSABY, Y. A. Genetic control of isoenzymes in Sitka Spruce. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 206-211, 1993.
- CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 34, p. 142-148, 1985.
- GEBUREK, T.; WANG, Q. Inheritance of isozyme variants and their linkage relationships in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* Hook.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 49, p. 193-201, 1990.
- GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.
- HUANG, Q. Q. *et al.* Genetic control of isozyme variation in Masson Pine, *Pinus massoniana* Lamb. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 285-292, 1994.
- KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. I. Inheritance of isozymes variants. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 25-37, 2001.
- LEWANDOWSKI, A. Inheritance and linkage of some allozymes in *Pinus armandii* Franch. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 79-82, 2000.
- \_\_\_\_\_.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 342-347, 1992.
- LIU, Z.; FURNIER, G. R. Inheritance and linkage of allozymes and restriction fragment length polymorphisms in Trembling Aspen. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 419-424, 1993.
- MARCHELLI, P.; GALLO, L. A. Genetic analysis of isozymes variants in open-pollinated families of southern beech (*Nothofagus nervosa* (Phill.) Dim. et Mil. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 90-98, 2000.
- MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G. G.; GIANNINI, R. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Pinus leucodermis* Ant. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 231-236, 1993.
- PAPAGEORGIOU, A. C. *et al.* Genetic analysis of isoenzyme variation in Mediterranean Cypress (*Cupressus sempervire* L.). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 109-111, 1993.
- PARKS, C. R. *et al.* Genetic control of isozyme variation in the genus *Liriodendron* L. (Magnoliaceae). **Journal of Heredity**, Cary, v. 81, p. 317-323, 1990.
- PASTORINO, M. J.; GALLO, L. A. Inheritance of isozyme variants in *Astrocedrus chileis* (D. Do) Florin et Boutelje. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, p. 15-20, 1998.
- PERRY, D. J.; KNOWLES, P. Inheritance and linkage relationships of allozymes of eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) in northwestern Ontario. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 245-250, 1989.
- POTENKO, V. Inheritance of allozymes and genetic variation in natural population of Japanese Yew in Petrov Island, Russia. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 307-313, 2001.
- SHIRAISHI, S. Inheritance of isozymes variation in Japanese Black Pine, *Pinus thunbergii* Parl. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 93-100, 1988.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. New York: Copyright Ltd., 1981. 859 p.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBION, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, p. 191-196, 2002.
- WANG, C. T.; LIN, T. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme, and estimation of outcrossing rate in a seed orchard of *Cunninghamia konishii* Hay. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, p. 33-37, 1998.
- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.
- \_\_\_\_\_.; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating population. **Heredity**, Lund, v. 43, p. 105-111, 1979.
- YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32**: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. Edmonton: University of Alberta, 1999. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>>. Acesso em: 30 mar. 2004.

## HERANÇA E LIGAÇÃO EM ISOENZIMAS DE *Tabebuia cassinoides*\*

Alexandre Magno SEBBENN\*\*  
Carlos Eduardo Sícoli SEOANE\*\*\*

### RESUMO

A herança e a ligação foram estudadas em oito sistemas isoenzimáticos revelados em 21 progênies de polinização aberta de *Tabebuia cassinoides* (Lam.) D.C. (caixeta) amostradas em populações do Estado de São Paulo. Doze zonas enzimáticas foram consistentemente identificadas, sendo todas polimórficas. A segregação dos locos foi homogênea entre as árvores e não foram detectados fortes indícios de desvio de segregação mendeliana. O loco *6pgdh-1* apresentou desvios significativos da razão de segregação esperada 1:1, mas o tamanho amostral utilizado indica a necessidade de reavaliação desse padrão, usando maior número de árvores heterozigotas. Evidências de ligação foram detectadas entre três pares de locos: *Pgi-2:Idh-1*, *Pgm-1:Per-1* e *Per-2:Est-1*.

Palavras-chave: herança; isoenzimas; *Tabebuia cassinoides*; espécies arbóreas tropicais.

### 1 INTRODUÇÃO

*Tabebuia cassinoides* (Lam.) D.C. (Bignoniaceae) ou caixeta é uma espécie arbórea pioneira, geralmente de pequeno porte (máximo 20 m de altura e 100 cm de diâmetro à altura do peito - DAP). O tronco é irregular, geralmente tortuoso e apresenta raízes aéreas na base (Carvalho, 1994). Segundo Carvalho (1994), a espécie distribui-se entre as latitudes 8°S (PE) e 26°S (SC), na faixa litorânea brasileira. *T. cassinoides* ocorre em terrenos permanentemente alagados ou encharcados, formando em alguns locais, agrupamentos densos, às vezes quase puros. A frequência é irregular e descontínua, uma vez que tem ocorrência localizada restrita aos locais brejosos próximos ao litoral. A espécie é exclusiva da Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica), nas formações Terras Baixas e Baixo-Montana e nas Formações Pioneiras de influência pluvial. Ocorre, também, na restinga. Nessas formações, ocupa os estratos superior e intermediário. A brotação é intensa após o corte, permitindo que a espécie possa ser manejada pelo sistema de talhadia.

### ABSTRACT

Inheritance and linkage were studied in eight isoenzymes from 21 open-pollinated families of *Tabebuia cassinoides* (Lam.) D.C. (caixeta), sampled in populations from São Paulo State. Twelve enzyme zones were consistently identified. In all loci, the segregation ratio was homogeneous among heterozygous trees and evidences of departure from expected mendelian segregation were not detected. *6pgdh-1* locus showed significant deviation from the expected 1:1 segregation ratio, but it is necessary to enlarge the sample size to better the evaluation. Linkage evidences were detected in three pairs of loci: *Pgi-2:Idh-1*, *Pgm-1:Per-1* and *Per-2:Est-1*.

Key words: inheritance; isozymes; *Tabebuia cassinoides*; tropical tree species.

Sua madeira é muito utilizada como matéria-prima para artesanato, devido à leveza e maleabilidade (Carvalho, 1994). *T. cassinoides* é explorada pelo homem há mais de 50 anos, e hoje muitas de suas populações já desapareceram ou se apresentam abandonadas devido à baixa produtividade.

A estrutura genética de populações, o sistema de reprodução e os efeitos da seleção têm sido extensivamente estudados em populações naturais de espécies arbóreas usando análises de isoenzimas (Roberds & Brotschol, 1985). Dessas aplicações, o estudo da estrutura genética e do sistema de reprodução requerem que o modo de herança e a relação de ligação entre as isoenzimas sejam conhecidos (Furnier *et al.*, 1986; Gillet & Hattemer, 1989; Lewandowski *et al.*, 1992; Thorsén *et al.*, 1997), a fim de se obter estimativas confiáveis dos parâmetros estimados. O objetivo do presente trabalho é estudar a herança e a relação de ligação entre 12 locos isoenzimáticos revelados em populações de *T. cassinoides* do Estado de São Paulo.

(\*) Aceito para a publicação em outubro de 2004.

(\*\*) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

(\*\*\*) Instituto Brasileiro de Recuperação Ambiental e Desenvolvimento Sustentável – IBRAS, Rua Ignez Peixoto, 565, cs7, 24346-070, Niterói, RJ, Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

O trabalho foi realizado a partir da coleta de sementes de polinização aberta em 10 e 11 árvores em duas ocorrências naturais de *T. cassinoides* no município de Iguape-SP. Uma população está localizada na Estação Ecológica de Juréia-Itatins do Instituto Florestal de São Paulo, e outra na propriedade particular Fazenda Cindomel. Adicionalmente às sementes, foram amostrados tecidos foliares das árvores adultas onde eram coletadas as sementes. De cada árvore matriz foram avaliadas, por eletroforese de isoenzimas, dez plântulas.

### 2.2 Eletroforese de Isoenzimas

A eletroforese de isoenzimas foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de 2/3 de amido de milho (penetrose 30) a 13%, combinado com 1/3 de amido de batata. As corridas foram realizadas em geladeira com temperatura de 5°C, mantendo-se a corrente constante em 35 mA nos eletrodos. As enzimas foram extraídas de tecidos foliares de árvores adultas e plântulas com um ano de idade, empregando-se aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP 40), 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP-60) e 200 µl de solução de extração número três de Soltis & Soltis (1989) para tecidos com alta concentração de compostos secundários. O tampão do eletrodo e do gel utilizado foi o Histidina, pH 6,6 (Alfenas, 1998). As isoenzimas reveladas foram: Alfa-esterase ( $\alpha$ -EST-E.C. 3.1.1.1), Fosfoglucomutase (PGM-E.C. 2.7.5.1), 6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH-E.C. 1.1.1.44), Fosfoglucose isomerase (PGI-E.C. 5.3.1.9), Isocitrato desidrogenase (IDH-E.C. 1.1.1.42), Malato desidrogenase (MDH-E.C. 1.1.1.37), Peroxidase (PER-E.C. 1.11.1.7) e Xiquimato desidrogenase (SKDH-E.C. 1.1.1.25). O protocolo de revelação das isoenzimas é o mesmo apresentado por Alfenas (1998).

### 2.3 Análise de Segregação

O estudo da herança isoenzimática de *T. cassinoides* foi realizado com base no método descrito por Gillet & Hattemer (1989), que compara o genótipo de árvore materna com a segregação de suas progênies de polinização aberta. As seguintes condições devem ser satisfeitas:

a) toda progênie de uma árvore materna  $A_iA_i$  deve possuir o alelo  $A_i$  da árvore mãe; b) em casos de uma árvore-mãe heterozigota ( $A_iA_j$ ,  $i \neq j$ ): i) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna,  $A_i$ ,  $A_j$ ; ii) o número de progênies heterozigotas  $A_iA_j$  ( $N_{ij}$ ) deve ser igual à soma das progênies homozigotas  $A_iA_i$  ( $N_{ii}$ ) e  $A_jA_j$  ( $N_{jj}$ ),  $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ , e iii) o número de progênies heterozigotas  $A_iA_k$  ( $N_{ik}$ ) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas  $A_jA_k$  ( $N_{jk}$ ),  $N_{ik} = N_{jk}$ , com  $k \neq i, j$ . Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1, usando um teste  $G$  (Sokal & Rohlf, 1981) com um grau de liberdade. Posteriormente, todos os testes individuais foram somados e um teste de  $G$  total foi obtido ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ), com  $n$  graus de liberdade, sendo  $n$  o número de progênies usadas no teste. Simultaneamente, os fenótipos observados foram somados e um teste  $G$  agrupado para a segregação 1:1 foi obtido ( $G_{1:1Agrupado}$ ), com um grau de liberdade. A hipótese de heterogeneidade de segregação entre progênies foi realizada utilizando-se um teste  $G$  de heterogeneidade ( $\sum G_{Heterogeneidade}$ ), obtido pela subtração do teste  $G$  agrupado ( $G_{1:1Agrupado}$ ), do teste  $G$  total ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ). Esses testes são aditivos, assim  $\sum G_{Hipótese1:1} = \sum G_{Heterogeneidade} + G_{1:1Agrupado}$ , com  $n$ ,  $n-1$  e  $1$  grau de liberdade, respectivamente (Sousa *et. al.*, 2002). Se os testes resultavam significativos, progênies de árvores heterozigotas que apresentaram desvios da segregação 1:1 eram excluídas do conjunto de dados e as análises eram repetidas. Os locos foram designados com letras e números, e os alelos com números em ordem decrescente de migração do ânodo para o cátodo.

### 2.4 Ligação

O teste de equilíbrio de ligação foi analisado usando-se a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows,  $\Delta_{ij}$  (Weir, 1979). Essa medida é apropriada para situações em que existam indícios de que a união de gametas não ocorreu de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir & Cockerham, 1979).

A hipótese nula de equilíbrio de ligação ( $\Delta_{ij} = 0$ ) foi testada com o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) descrito em Weir (1979). Essas estimativas foram obtidas com auxílio do programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os oito sistemas isoenzimáticos avaliados em *T. cassinoides* revelaram 12 zonas de atividade enzimática passíveis de interpretação genética. Os esquemas demonstrando a forma de interpretação das isoenzimas e os respectivos locos são apresentados na FIGURA 1. Todos os 12 locos eram polimórficos, segregando de dois a quatro alelos por loco. A seguir são descritos os padrões de herança, segregação e desequilíbrio de ligação nas isoenzimas estudadas.

#### 3.1 Padrões Isoenzimáticos

##### a) Fosfogluose Isomerase (PGI)

O sistema PGI apresentou duas zonas de atividades (*Pgi-1* e *Pgi-2*) com variação (FIGURA 1). A zona de migração mais rápida (*Pgi-1*) não apresentou padrão de resolução que permitisse a interpretação genética e por isso foi descartada da análise. A segunda zona, denominada loco *Pgi-2*, apresentou variação e foi interpretada como um loco polimórfico segregando três alelos. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos nos géis indicou que esse loco é controlado por uma enzima dimérica (heterozigotos com três bandas). Duas zonas de atividade na enzima PGI têm sido detectadas em diversos estudos com espécies arbóreas, como em *Picea glauca* (Moench) Voss (King & Dancik, 1983), *Taxus baccata* L. (Lewandowski *et al.*, 1992), *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Sousa *et al.*, 2002), *Genipa americana* L. (Sebbenn, 2004) e *Caesalpinia echinata* Lam. (Giudice-Neto *et al.*, 2004).

##### b) Fosfoglucomutase (PGM)

O sistema PGM apresentou duas zonas de atividade enzimática (*Pgm-1* e *Pgm-2*), ambas polimórficas e segregando três alelos em cada loco (FIGURA 1). Observando os zimogramas de árvores heterozigotas verifica-se a presença de três bandas, indicando tratar-se de locos diméricos. Duas zonas de atividade também foram observadas em *Pinus taeda* L. (Adams & Joly, 1980),

*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco (El-Kassaby *et al.*, 1982) e *Acer pseudoplatanus* L. (Konnert *et al.*, 2001), entre outras espécies.

##### c) Alfa-Esterase ( $\alpha$ -EST)

Este sistema apresentou duas zonas de atividade, *Est-1* e *Est-2*, ambas polimórficas (FIGURA 2), segregando quatro e três alelos, respectivamente. Observando os fenótipos de árvores heterozigotas verifica-se tratar de locos controlados por enzimas monoméricas. Duas zonas de atividade nessa enzima também foram reportadas para espécies como *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch. (Ying & Morgenstern, 1990) e *Cecropia pachystachya* Trec. (Ribas & Sebbenn, 2004).

##### d) Isocitrato Desidrogenase (IDH)

O sistema IDH apresentou apenas uma zona de atividade (FIGURA 1). Essa zona (*Idh-1*) foi interpretada como um loco de expressão dimérica, visto que os indivíduos heterozigotos apresentavam três bandas. Nesse sistema, uma zona de atividade também tem sido reportada em outras espécies arbóreas como *P. taeda* (Adams & Joly, 1980) e *P. menziesii* var. *menziesii* (El-Kassaby *et al.*, 1982).

##### e) Malato Desidrogenase (MDH)

O sistema MDH apresentou três zonas de atividade enzimática. A zona de migração mais rápida não apresentou padrão de resolução que permitisse a interpretação genética. As outras duas zonas foram interpretadas como locos polimórficos (*Mdh-1* e *Mdh-2*), controlados por enzimas diméricas, segregando três alelos cada (FIGURA 1). Em espécies arbóreas, o sistema MDH tem apresentado de duas a três zonas de atividade (Adams & Joly, 1980; King & Dancik, 1983; Ying & Morgenstern, 1990; Thorsén *et al.*, 1997; Konnert *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002; Zhelev *et al.*, 2002).

##### f) Peroxidase (PER)

O sistema PER apresentou duas zonas (*Per-1* e *Per-2*) de atividade enzimática passíveis de interpretação (FIGURA 1). Os fenótipos de indivíduos heterozigóticos apresentaram duas bandas, padrão típico de enzimas monoméricas. Foi observada a segregação de dois alelos em cada loco. Duas zonas de atividade também foram observadas nessa enzima em *Pinus thunbergii* Parl. (Shiraishi, 1988), *Fagus sylvatica* L. (Müller-Starck & Starke, 1993) e *Populus tremuloides* Michx. (Liu & Fournier, 1993).

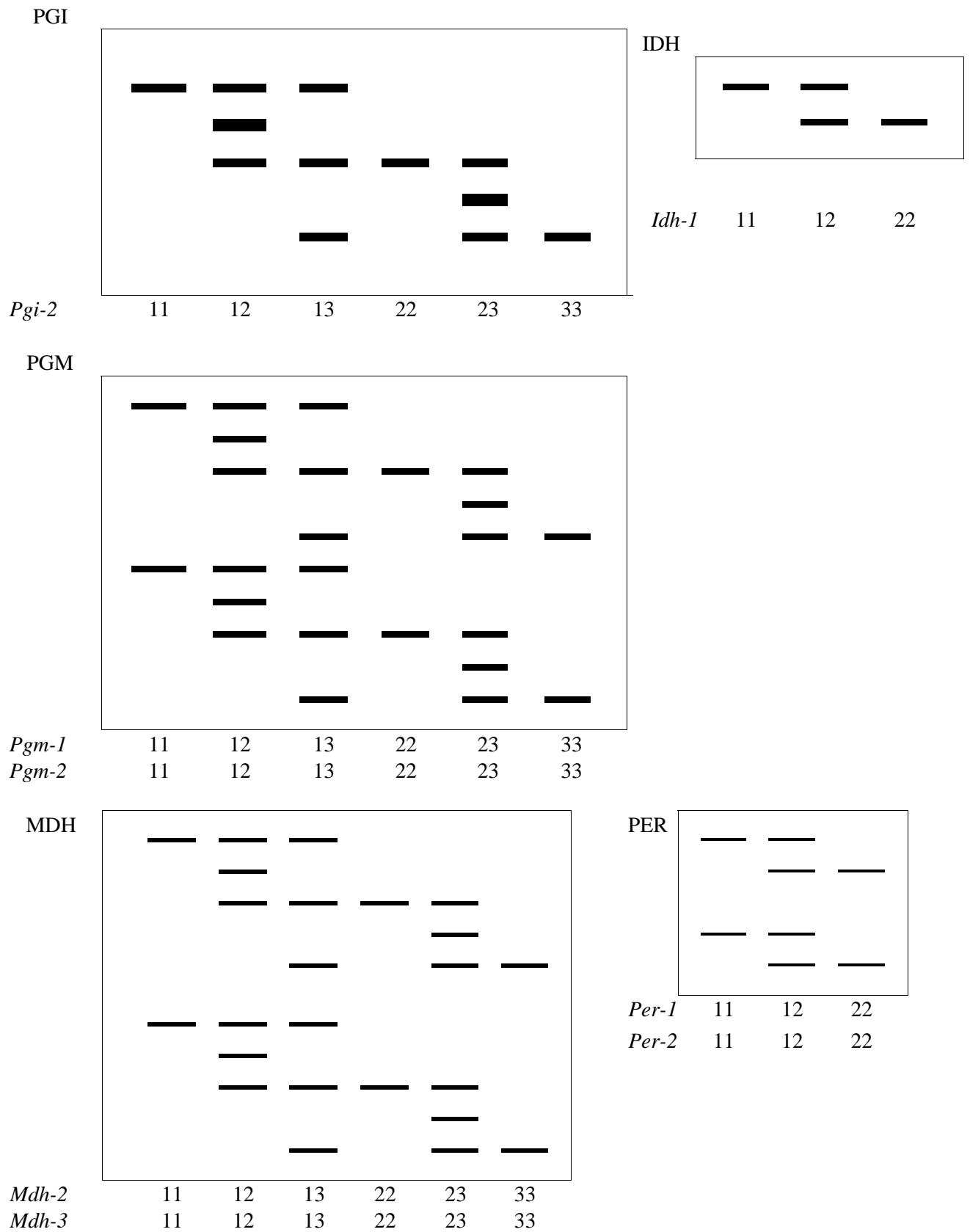


FIGURA 1 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *T. cassinoides* nos sistemas PGI, PGM, MDH, IDH e PER, juntamente com seus respectivos genótipos.

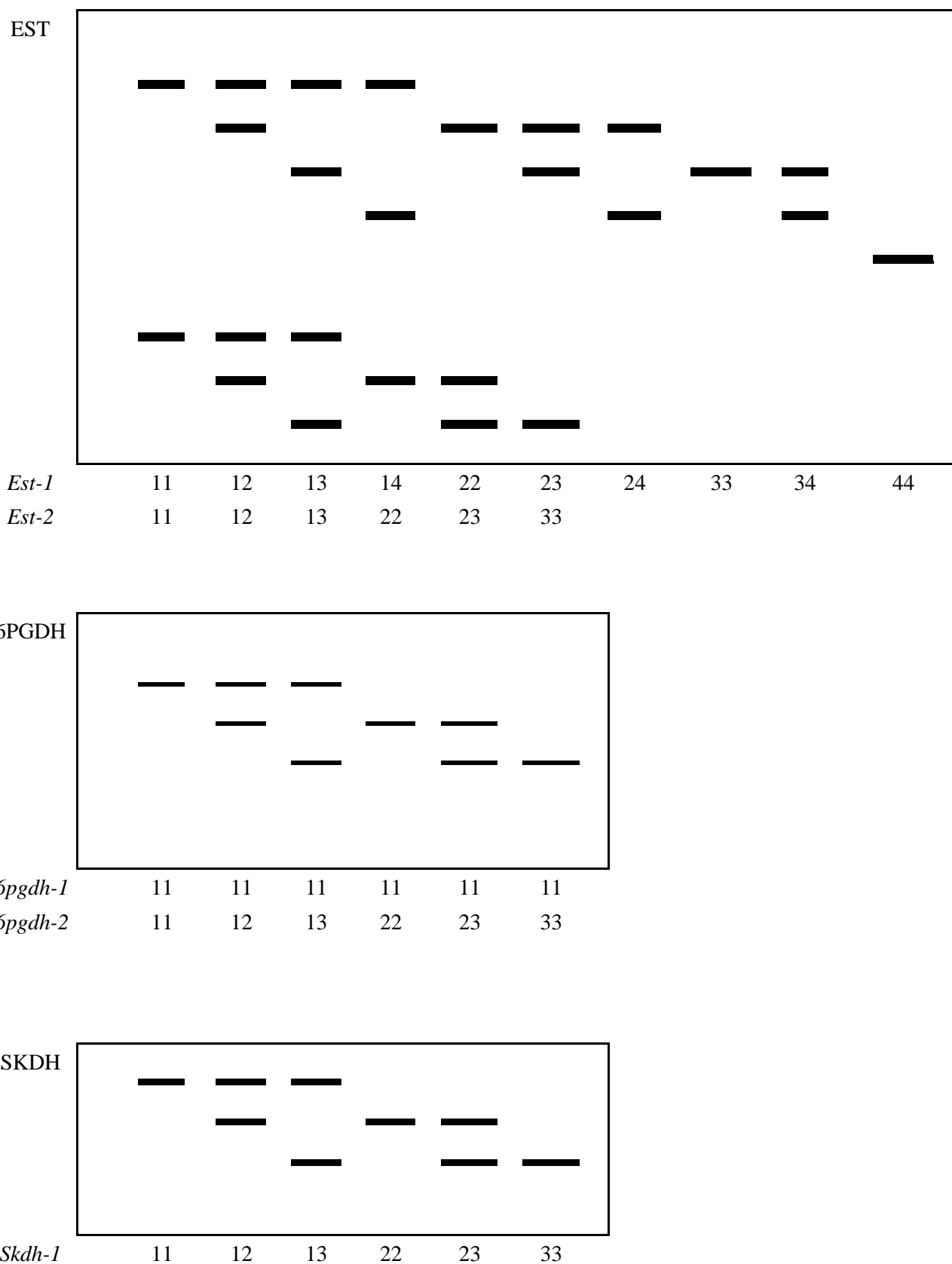


FIGURA 2 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *T. cassinoides* nos sistemas EST, 6PGDH e SKDH, juntamente com seus respectivos genótipos.

### g) *Xiquimato Desidrogenase* (SKDH)

O sistema SKDH apresentou uma zona de atividade (*Skdh-1*) nas condições de eletroforese utilizadas (FIGURA 2). Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico controlado por uma enzima monomérica (heterozigoto apresentando duas bandas nos géis e segregando três alelos). Em *Populus tremuloides* Michx., Liu & Furnier (1993) também detectaram somente uma zona de atividade nesse sistema.

### h) *Fosfogluconato Desidrogenase* (6PGDH)

O sistema 6-PGDH apresentou duas zonas de atividade nos géis (FIGURA 2). O loco de migração mais rápida (*6-Pgdh-1*) não apresentou variação e foi interpretado como um loco monomórfico com um alelo fixado. O loco de migração mais lenta nos géis (*6-Pgdh-2*) era variável e segregou até três alelos. Os fenótipos de indivíduos heterozigotos apresentavam três bandas indicando tratar-se de enzima dímera. Diversos outros estudos com espécies arbóreas têm observado duas zonas de atividade nessa enzima (Ying & Morgenstern, 1990; Konnert *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002; Zhelev *et al.*, 2002).

## 3.2 Padrões de Segregação

O teste de segregação mendeliana em locos isoenzimáticos de *T. cassinoides* foi realizado agrupando progênies de árvores heterozigotas de mesmo genótipo materno, devido ao pequeno tamanho amostral (dez plântulas tomadas de cada progênie) (TABELA 1). Os sistemas PGM e IDH não puderam ter seus padrões de herança avaliados devido à ausência de progênies de árvores heterozigotas na amostra. Nos demais sistemas isoenzimáticos foram detectados locos contendo progênies de árvores heterozigotas e os padrões de segregação detectados puderam ser avaliados. Os locos *Est-1*, *Est-2*, *Mdh-2* e *Skdh-1* não apresentaram qualquer indicio de desvios de segregação, tanto no teste  $G$  total ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ), de heterogeneidade ( $\sum G_{Heterogeneidade}$ ), como no teste da hipótese de segregação agrupada 1:1 ( $G_{1:1Agrupado}$ ), assim, pode-se considerar que esses locos estão sob controle genético de locos codominantes. Os locos *Pgi-2*, *Mdh-3*, *Per-1*, *Per-2* e *6pgdh-1* apresentaram desvios de segregação esperada 1:1 (locos codominantes), em pelo menos um dos três testes realizados.

Contudo, quando foram excluídas as progênies de árvores heterozigotas que apresentavam desvios da segregação individual esperada 1:1, os locos *Pgi-2*, *Mdh-3* e *Per-1* ajustaram-se às proporções esperadas em todos os testes. O loco *Per-2* apresentou indícios de desvios de segregação no teste agrupado ( $G_{1:1Agrupado}$ ), mesmo após a exclusão das progênies mostrando desvios de segregação no teste individual. O desvio foi causado pelo excesso de homozigotos (25 heterozigotos: 44 homozigotos), sugerindo a possibilidade da existência de um alelo nulo nesse loco ou variações amostrais aleatórios.

O loco *6pgdh-1* apresentou desvios de segregação significativos a 99% de probabilidade no teste total ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ) e de heterogeneidade ( $\sum G_{Heterogeneidade}$ ). Porém, não foi possível excluir progênies desse loco, porque todas as três apresentaram desvios da segregação esperada 1:1. Como neste caso só foram avaliadas três progênies, resultando em um baixo tamanho amostral (30 progênies), para confirmar o desvio observado seria interessante a reavaliação dos padrões de segregação desse loco usando um número maior de progênies. Isto permitiria concluir, com mais precisão, sobre os reais padrões de segregação nesse loco e sua herança genética. Distorções de segregação em locos da enzima 6PGDH também têm sido detectados em outros estudos realizados com espécies arbóreas (Adams & Joly, 1980; Strauss & Conkle, 1986; Chaisurisri & El-Kassaby, 1993; Sousa *et al.*, 2002). Segundo Adams & Joly (1980), Furnier *et al.* (1986) e Strauss & Conkle (1986) as distorções de segregação podem ser atribuídas à seleção ocorrendo entre meiose e fertilização, ou forte ligação entre alelos isoenzimáticos e alelos deletérios. Outra causa pode ser a presença de alelos nulos, quando as distorções são causadas por excesso de homozigotos, como neste caso. Como os alelos nulos não são detectados, indivíduos homozigóticos para o alelo nulo não são revelados e os heterozigóticos aparecem nos géis apenas com uma simples banda, sendo interpretados como fenótipos homozigotos para o alelo alternativo do alelo nulo.

Em suma, não existem evidências suficientes para rejeitar a hipótese de que os locos avaliados em *T. cassinoides* não estejam sob controle genético, e aparentemente todos estão segregando nas proporções mendelianas 1:1.

TABELA 1 – Teste para hipótese de segregação regular (G) de marcadores isoenzimáticos em *Tabebuia cassinoides*.

Loco	Genótipo materno	Caso	Número de árvores (n)	$\sum N_{ij} : \sum (N_{ii} + N_{jj})$	$\sum G_{HipóteseI}$	$\sum G_{Heterogeneidade}$	$G_{I, Agrupado}$	Árvores com desvio de segregação
						GL = n-1	GL = 1	
<i>Pgi-2</i>	$A_1A_2$	a	14	53:79	31,42**	26,27**	5,15*	3
		b	11	44:59	7,73	5,54	2,19	
<i>Est-1</i>	$A_1A_2$	a	6	24:25	11,75	11,73	0,02	2
		b	4	16:16	2,89	2,80	0,03	
<i>Est-2</i>	$A_1A_2$	a	11	41:62	13,47	9,16	4,31	3
		b	8	39:54	9,61	7,18	2,43	
<i>Mdh-2</i>	$A_1A_2$	a	8	40:39	11,18	11,17	0,01	2
		b	6	24:35	3,47	1,41	0,06	
<i>Mdh-3</i>	$A_1A_2$	a	6	19:41	11,40	3,15	8,26**	2
		b	4	15:25	3,69	2,17	2,53	
<i>Per-1</i>	$A_1A_2$	a	5	24:27	16,81**	16,63**	0,18	2
		b	3	15:16	4,41	4,14	0,27	
<i>Per-2</i>	$A_1A_2$	a	8	27:52	12,94	4,89	8,05**	2
		b	7	25:44	9,09	3,74	5,30*	
<i>Skdh-1</i>	$A_1A_2$	a	8	29:45	5,39	1,90	3,49	2
		b	6	27:31	1,53	1,26	0,28	
<i>6pgdh-1</i>	$A_1A_2$	a	3	3:27	22,08**	22,08**	0,0	3

$N_{ij}$  e  $N_{ii} + N_{jj}$  são os números observados dos genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

a) Inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco.

b) Exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(\*)  $P < 0,05$ .

(\*\*)  $P < 0,01$ .

### 3.3 Ligação

Dos 66 pares de combinações possíveis entre os 12 locos isoenzimáticos detectados em *T. cassinoides*, foram observados desvios significativos da hipótese de segregação independente em três pares *Pgi-2:Idh-1*, *Pgm-1:Per-1* e *Per-2:Est-1* (TABELA 2). Embora, aparentemente esses locos estejam fisicamente ligados ou em desequilíbrio gamético, a baixa magnitude da medida de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ) e do valor de qui-quadrado indicam que as ligações não são fortes. A maior medida de desequilíbrio de ligação ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ) foi observada entre a combinação dos locos *Per-2:Est-1*, embora este valor seja baixo, 0,047, considerando a amplitude de valores que o estimador pode assumir (-0,25 a 0,25). Ainda, o teste de qui-quadrado detectou desequilíbrio de ligação a 99% de probabilidade apenas para os locos *Pgm-1:Per-1*, nos demais pares de locos a probabilidade de ligação foi fraca.

A exclusão de um dos locos de cada par de ligações quebra a associação entre estes, assim podem ser usados em estudos onde a hipótese de ausência de ligação é requerida como sistema de reprodução, estrutura genética e análise de paternidade. Locos em desequilíbrio de ligação viciam as estimativas multiloco de parâmetros genéticos. Porém, os baixos níveis aparentes de ligação observados sugerem que as ligações possam ter poucos efeitos nas estimativas multiloco de parâmetros genéticos. Os maiores efeitos podem ser esperados entre os locos *Pgm-1:Per-1*. O desequilíbrio de ligação detectado entre os locos *Pgi-2:Idh-1*, *Pgm-1:Per-1* e *Per-2:Est-1* não é reportado em nenhum outro estudo com espécies arbóreas.

Finalmente, nos demais pares de combinações entre locos não foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação, pode-se afirmar que os alelos de diferentes locos não estão ligados ou em desequilíbrio gamético e segregam independentemente entre si.

TABELA 2 – Valores da medida composta de Burrows para o desequilíbrio gamético ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ), resultados do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e probabilidade associada (*P*) para pares de locos isoenzimáticos que apresentaram desvios significativos da hipótese de desequilíbrio de ligação em populações de *Tabebuia cassinoides*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$	<i>P</i>
<i>Pgi-2:Idh-1</i>	0,022	5,74*	0,017
<i>Pgm-1:Per-1</i>	-0,008	6,95**	0,008
<i>Per-2:Est-1</i>	0,047	4,29*	0,038

(\*) *P* < 0,05.

## 4 CONCLUSÕES

Não foram detectados fortes indícios de desvios de segregação mendeliana nos locos isoenzimáticos revelados em *T. cassinoides*.

Foram detectados indícios significativos de ligação entre os pares de locos *Pgi-2:Idh-1*, *Pgm-1:Per-1* e *Per-2:Est-1* em *T. cassinoides*.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento do projeto, e aos três revisores anônimos pelas valiosas sugestões e correções realizadas no prévio manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 71, p. 33-40, 1980.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 574 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.

- CHAISURISRI, K.; EL-KASSABY, Y. A. Genetic control of isoenzymes in Sitka pruce. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, n. 3, p. 206-211, 1993.
- EL-KASSABY, Y. A.; YEH, F. C.; SZIKLAI, O. Inheritance of allozyme variants in Coastal Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 24, p. 325-335, 1982.
- FURNIER, G. R. *et al.* Inheritance and linkage of allozymes in seed tissues of whitbark pine. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 28, p. 601-604, 1986.
- GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.
- GIUDICE-NETO, J. del; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Herança e ligação em locos isoenzimáticos de *Caesalpinia echinata*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 101-110, 2004.
- KING, J. N.; DANCİK, B. P. Inheritance and linkage of isozymes in white spruce (*Picea glauca*). **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 25, p. 430-336, 1983.
- KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. I. Inheritance of isozymes variants. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 25-37, 2001.
- LEWANDOWSKI, A.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 342-347, 1992.
- LIU, Z.; FURNIER, G. R. Inheritance and linkage of allozymes and restriction fragment length polymorphisms in Trembling Aspen. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 419-424, 1993.
- MÜLLER-STARCK, G.; STARKE, R. Inheritance of isoenzymes in European Beech (*Fagus sylvatica* L.). **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 291-296, 1993.
- RIBAS, L. A.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio gamético em sete locos isoenzimáticos de *Cecropia pachystachya*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 111-119, 2004.
- ROBERDS, J. H.; BROTSCHOL, J. V. Linkage disequilibrium among allozyme loci in natural populations of *Liriodendron tulipifera* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 34, p. 137-141, 1985.
- SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio gamético em algumas isoenzimas polimórficas em *Genipa americana* L. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 65-72, 2004.
- SHIRAISHI, S. Inheritance of isozymes variation in Japanese Black Pine, *Pinus thunbergii* Parl. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 93-100, 1988.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. New York: Copyright Ltd., 1981. 859 p.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. p. 46-67.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, p. 191-196, 2002.
- STRAUSS, S. H.; CONKLE, M. T. Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone pine. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, v. 72, p. 483-493, 1986.
- THORSÉN, J. *et al.* Inheritance and linkage of isozymes loci in the Basket Willow (*Salix viminalis* L.). **The Journal of Heredity**, Cary, v. 88, p. 144-150, 1997.
- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.
- \_\_\_\_\_.; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity**, Lund, v. 43, p. 105-111, 1979.
- YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32**: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. Edmonton: University of Alberta, 1999. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>> Acesso em: 30 mar. 2004.
- YING, L.; MORGENSTERN, E. K. Inheritance and linkage relationships of some isozymes of *Larix laricina* in New Brunswick, Canada. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 39, p. 245-251, 1990.
- ZHELEV, P.; GÖMÖRY, D.; PAULE, L. Inheritance and linkage of allozymes in a Balkan endemic, *Pinus peuce* Griseb. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 93, p. 60-62, 2002.

# PTERIDÓFITAS DA FLORESTA ESTADUAL DE BEBEDOURO, BEBEDOURO, SP, BRASIL<sup>1</sup>

Áurea Maria Therezinha COLLI<sup>2</sup>  
Alexandre SALINO<sup>3</sup>  
Alessandro Chagas FERNANDES<sup>4</sup>  
Clayton Martins RANGEL<sup>4</sup>  
Ricardo Alexandre BARBOSA<sup>4</sup>  
Rogério Aparecido CORREA<sup>4</sup>  
Wagner Fernando da SILVA<sup>4</sup>

## RESUMO

Neste trabalho realizou-se um levantamento de pteridófitas na Floresta Estadual de Bebedouro, localizada no município de Bebedouro, sob as coordenadas 20°57' de latitude S e 48°30' de longitude W. As coletas foram realizadas em três trilhas denominadas "Trilha da Floresta de Produção", "Trilha da Mata Ciliar" e "Trilha do Viveiro". Foram reconhecidas dez espécies de pteridófitas pertencentes a cinco famílias. Destas, as mais representativas foram Pteridaceae com quatro espécies distribuídas em quatro gêneros e Polypodiaceae com três espécies distribuídas em dois gêneros. Das dez espécies registradas sete apresentaram distribuição bastante restrita, ocorrendo apenas na "Trilha da Mata Ciliar" e duas, *Cheilantes concolor* Langsd. & Fisch. e *Thelypteris dentata* (Forssk.) E. St. John, foram as de ocorrência mais ampla. Em todas as trilhas ocorreram pteridófitas, sendo que a "Trilha da Mata Ciliar" foi a mais rica. As pteridófitas ocorrem no cerrado "sensu stricto", na mata ciliar e na mata estacional semidecidual. A maior riqueza de espécies ocorre na mata ciliar e na mata estacional semidecidual.

Palavras-chave: diversidade; florística; pteridófitas; Floresta Estadual de Bebedouro.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Tryon (1986) a região Sudeste do Brasil apresenta cerca de 600 espécies de pteridófitas. O Estado de São Paulo apresenta cerca de 500 espécies distribuídas em 25 famílias e aproximadamente 50 gêneros. A grande maioria das espécies de pteridófitas ocorre na mata atlântica

## ABSTRACT

This work presents a pteridophytical survey carried out at Bebedouro State Forest, in the municipality of Bebedouro (20°57'S and 48°30'W). Collections were accomplished at three trails: "Trilha da Floresta de Produção", "Trilha da Mata Ciliar" and "Trilha do Viveiro". Ten species of Pteridophyta were recognized. From these, the most representative ones were Pteridaceae with four species distributed into four genera and Polypodiaceae with three species distributed into two genera. From the ten registered species, seven had a very restricted distribution occurring only in the "Trilha da Mata Ciliar" but *Cheilantes concolor* and *Thelypteris dentata* presented a wider occurrence. There were pteridophytes at all the trails and "Trilha da Mata Ciliar" was found to be the richest in species. Pteridophytes occur in cerrado "sensu stricto", semideciduous forest and gallery forest. The diversity is found in the gallery forest and semideciduous forest.

Key words: diversity; floristic; pteridophytes; Bebedouro State Forest.

ao longo da Serra do Mar, nas matas da Serra da Mantiqueira e nas do Vale do Ribeira, ao passo que na mata atlântica localizada nos planaltos do interior, chamada de mata estacional semidecidual de planalto e de encosta, e ao longo de cursos de água do interior do estado, chamada de mata ciliar, apresenta diversidade menor (Salino, 1993).

(1) Aceito para publicação em outubro de 2004.

(2) FAFIBE, FFCLSJRP, Rua João Mutarelli, 180, 14700-000, Porto Ferreira, SP, Brasil. E-mail: aureacolli@linkway.com.br

(3) UFMG, Departamento de Botânica, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil.

(4) FAFIBE, Departamento de Ciências Biológicas, Rua Prof. Orlando França de Carvalho, 325, 14701-070, Bebedouro, SP, Brasil.

Apesar da baixa diversidade de espécies de pteridófitas existentes no interior do Estado de São Paulo, poucos estudos têm sido realizados sobre a flora pteridofítica, destacando-se os de Brade (1937, 1951), Pereira-Noronha (1989), Esteves & Melhem (1992), Windisch (1992), Simabukuro *et al.* (1994a), Salino (1996), Prado (1998), Siqueira & Windisch (1998), Hirai & Prado (2000) e Prado & Labiak (2001).

O presente estudo é uma contribuição a florística de pteridófitas das formações vegetais do interior do Estado de São Paulo, através de levantamento na Floresta Estadual de Bebedouro. As informações obtidas podem subsidiar outras pesquisas como, por exemplo, a fenologia de algumas espécies de pteridófitas, bem como atividades de Educação Ambiental, como visitas realizadas por alunos do ensino médio e fundamental a trilhas da Floresta.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A Floresta de Bebedouro, com área de 96 ha, está sob responsabilidade administrativa do Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e localiza-se entre as coordenadas 20°57'S de latitude e 48°30'W de longitude. O clima da região é caracterizado, segundo a classificação de Köppen *apud* Tabanez & Rosa (1994) como tropical úmido (AW), com uma precipitação média de 1.450 mm. Os solos pertencem à unidade taxonômica Latossolo Roxo, comumente conhecida como terra roxa (Tabanez & Rosa, 1994), e a análise química indicou que nas regiões de mata estacional semidecidual e mata ciliar o pH é básico (pH = 8,0), e na região de cerrado o solo é fortemente ácido (pH = 5,0) e verificou-se altas taxas de Al (9 mmol.dm<sup>3</sup>).

Na Floresta de Bebedouro são realizadas pesquisas e experimentação florestal, conservação de recursos naturais e reflorestamento com fins conservacionistas (Tabanez & Rosa, 1994).

A vegetação da Floresta de Bebedouro enquadra-se, segundo Tabanez & Rosa (1994) como cerrado “sensu stricto”, mata estacional semidecidual e uma de suas subformações, a mata ciliar.

Durante o ano de 2003, foram realizadas dez excursões para coletas de material botânico dos representantes da divisão Pteridophyta em três pontos da Floresta: Trilha da Mata Ciliar, Trilha da Floresta de Produção e Trilha do Viveiro. A Trilha da Mata Ciliar tem uma extensão de aproximadamente 800 metros e acompanha o Córrego do Retiro,

apresentando vegetação do tipo mata estacional semidecidual e mata ciliar; a Trilha da Floresta de Produção tem uma extensão de 3.000 metros e apresenta vegetação do tipo cerrado “sensu stricto” e plantações de *Pinus* e *Eucalyptus* e a Trilha do Viveiro apresenta uma extensão de cerca de 800 metros e a vegetação é cerrado “sensu stricto”. (Tabanez & Rosa, 1994). As coletas foram realizadas ao longo das margens das trilhas e em alguns pontos houve o adentramento em torno de 5 m.

Todo o material botânico coletado foi prensado no campo, herborizado segundo as técnicas usuais e incluído no acervo do Herbário das Faculdades Integradas FAFIBE. Algumas espécies de pteridófitas foram identificadas por comparação com o material depositado no Herbário do Instituto Florestal, e outras foram identificadas por especialistas.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No levantamento das pteridófitas da Floresta de Bebedouro, foram encontrados cinco famílias, dez gêneros e dez espécies. Do total de espécies, quatro pertencem à família Pteridaceae, três pertencem à família Polypodiaceae e uma pertence às famílias Cyatheaceae, Schizaeaceae e Thelypteridaceae (FIGURA 1).

Apesar da diversidade de formações vegetais existentes nos diferentes locais estudados, as famílias mais representativas, em número de espécies, da Floresta de Bebedouro também foram encontradas em outras áreas. Essas famílias mais representativas foram observadas na Serra da Juréia por Prado & Labiak (2001). Polypodiaceae foi a família de pteridófitas com espécies de hábito epífítico mais representativa na Reserva Volta Velha (SC) (Labiak & Prado, 1998), assim como na Floresta de Bebedouro. Quanto às famílias mais representativas, Salino (1996) encontrou resultados semelhantes no Morro do Cuscuzeiro, Analândia-SP, sendo estas: Pteridaceae, Polypodiaceae e Thelypteridaceae. No Parque Estadual do Rio Doce (MG) as famílias Pteridaceae e Thelypteridaceae também foram as mais representativas (Graçano *et al.*, 1998). Já, na Reserva Ecológica de Jangadinha (PE) a família Pteridaceae foi a mais representativa (Ambrósio & Barros, 1997). Assim, conclui-se que existem semelhanças florísticas, com relação às famílias de pteridófitas mais ricas em espécies, entre essas diferentes localidades.

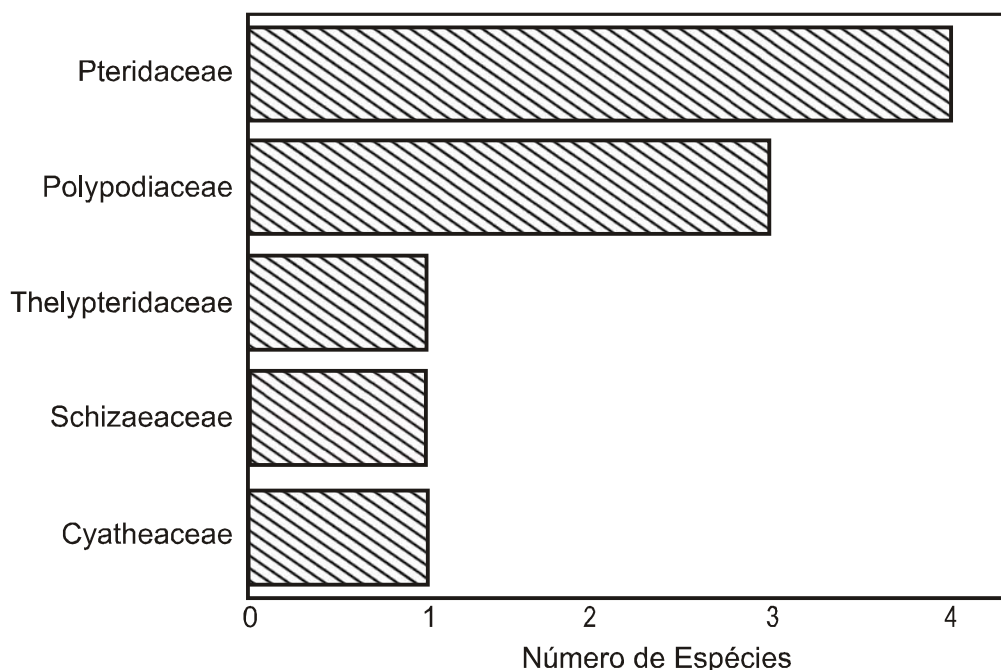


FIGURA 1 – Distribuição do número de espécies de pteridófitas pelas respectivas famílias da Floresta de Bebedouro, SP.

As famílias Pteridaceae e Thelypteridaceae ocorreram na Trilha da Mata Ciliar, Trilha da Floresta de Produção e Trilha do Viveiro nos habitats de cerrado “sensu stricto”, mata estacional semidecidual e mata ciliar; Polypodiaceae ocorreu na Trilha da Floresta de Produção e na Trilha da Mata Ciliar, nos mesmos habitats citados para as famílias anteriores, e Cyatheaceae e Schizaeaceae ocorreram somente na Trilha da Mata Ciliar nos habitats de mata estacional semidecidual e mata ciliar (TABELA 1).

Com relação à diversidade específica do grupo, sabe-se que as famílias Pteridaceae e Thelypteridaceae são de grande importância e representatividade nos trópicos (Tryon & Tryon, 1982), e na Floresta de Bebedouro Pteridaceae foi a família com maior número de espécies.

*Cheilantes concolor* e *Thelypteris dentata* foram as espécies que ocorreram em maior número de trilhas nos habitats de cerrado “sensu stricto”, mata estacional semidecidual e mata ciliar. *Pleopeltis angusta* ocorreu na Trilha da Floresta de Produção

e na Trilha da Mata Ciliar nos mesmos habitats citados para as espécies anteriores. Das dez espécies registradas, sete apresentam distribuição bastante restrita, ocorrendo apenas na Trilha da Mata Ciliar (TABELA 1).

No interior do Estado de São Paulo, onde está localizado o município de Bebedouro, as pteridófitas ocorrem nas regiões serranas, nas matas galerias, remanescentes de matas mesófilas semidecíduas e nas regiões de cerrado (Prado, 1998).

Todas as espécies de pteridófitas ocorreram em locais úmidos no interior das matas ou nos barrancos sombreados, das quais sete são terrestres e três são epífitas. Ranal (1995) verificou que as espécies de pteridófitas terrestres, *Adiantopsis radiata*, que ocorreu no presente estudo, e *Pteris denticulata* e *Polypodium latipes*, que não ocorreram no presente estudo, foram encontradas em solos que retêm maior quantidade de água, mantendo seus rizomas e raízes na camada superficial do substrato.

TABELA 1 – Distribuição de espécies de pteridófitas na Floresta de Bebedouro, 20°57'S e 48°30'W. A indicação dos ambientes de ocorrência é codificada pela legenda a seguir: Ambientes: TE = terrestre, EP = epífita. Habitat: CE = cerrado “sensu stricto”, MC = mata ciliar, MES = mata estacional semidecidual. Trilhas: TFP = Trilha da Floresta de Produção; TMC = Trilha da Mata Ciliar; TV = Trilha do Viveiro.

Família Espécie	Ambiente	Habitat	Trilhas
<b>CYATHEACEAE</b>			
<i>Cyathea delgadii</i> Sternb.	TE	MC, MES	TMC
<b>POLYPODIACEAE</b>			
<i>Pleopeltis angusta</i> Willd.	EP	CE, MC, MES	TFP, TMC
<i>Microgramma squamulosa</i> (Kaulf.) de la Sota	EP	MC, MES	TMC
<i>Microgramma persicariifolia</i> (Schrad.) C. Presl.	EP	MC, MES	TMC
<b>PTERIDACEAE</b>			
<i>Adiantopsis radiata</i> (L.) Fée	TE	MC, MES	TMC
<i>Adiantum raddianum</i> C. Presl.	TE	MC, MES	TMC
<i>Cheilantes concolor</i> Langsd. & Fisch.	TE	CE, MC, MES	TFP, TMC, TV
<i>Hemionitis tomentosa</i> (Lam.) Raddi	TE	MC, MES	TMC
<b>SCHIZAEACEAE</b>			
<i>Anemia villosa</i> Willd.	TE	MC, MES	TMC
<b>THELYPTERIDACEAE</b>			
<i>Thelypteris dentata</i> (Forssk.) E. St. John	TE	CE, MC, MES	TFP, TMC, TV

Quanto às espécies de hábito epífítico, *Pleopeltis angusta* ocorreu na Trilha da Mata Ciliar e na Trilha da Floresta de Produção, nos habitats de cerrado “sensu stricto”, mata ciliar e mata estacional semidecidual, e *Microgramma squamulosa* e *Microgramma persicariifolia* ocorreram na Trilha da Mata Ciliar nos habitats de mata ciliar e mata estacional semidecidual. Observou-se a presença de escassos números de espécies de pteridófitas com hábito epífítico na Floresta. Segundo Fontoura *et al. apud* Graçano *et al.* (1998), áreas de mata secundária apresentam um reduzido número de epífitas em relação às áreas de mata primária. Neste caso, a escassez de espécies epífitas pode ser um indicativo do caráter secundário das matas da Floresta de Bebedouro.

Das dez espécies de pteridófitas que ocorreram na Floresta de Bebedouro, oito foram registradas em três remanescentes florestais nos

municípios de Itirapina e Brotas (Salino, 1993), oito no Morro do Cuscuzeiro em Analândia (Salino, 1996) e três na mata ciliar da Reserva Biológica de Moji-Guaçu (Simabukuro *et al.*, 1994b). Prado & Labiak (2001) encontraram três dessas espécies ocorrentes na região, em floresta pluvial tropical da Serra da Juréia. A presença das mesmas espécies de pteridófitas nessas diferentes localidades é um indicativo da existência de semelhança florística, com relação as pteridófitas, nessas localidades.

Com relação ao habitat de cerrado, tem-se que das três espécies de pteridófitas que ocorrem na Floresta de Bebedouro neste habitat, duas também foram registradas por Salino (1996) no cerrado no Morro do Cuscuzeiro em Analândia e uma espécie foi registrada por Esteves & Melhem (1992) nos cerrados da Reserva Biológica de Moji-Guaçu.

Colli *et al.* (2003) encontraram duas dessas espécies também ocorrentes no habitat de cerrado, no mesmo habitat no Parque Estadual de Porto Ferreira. A presença das mesmas espécies de pteridófitas no habitat de cerrado, em diferentes localidades, é um indicativo da preferência ambiental e de semelhança florística, com relação às pteridófitas, nessas diferentes localidades.

#### 4 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Florestal pelo fornecimento das condições necessárias para a realização deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBRÓSIO, S. A.; BARROS, I. C. I. Pteridófitas de uma área remanescente de Floresta Atlântica do Estado de Pernambuco. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 105-113, 1997.
- BRADE, A. C. Pteridophytas coletadas em Campos do Jordão, em 1937 pelo Dr. Campos Porto e determinadas por A. C. Brade. **Rodriguésia**, São José do Rio Preto, v. 9, p. 113-116, 1937.
- \_\_\_\_\_. Relatório da excursão à Serra da Bocaina, no estado de São Paulo, realizada pelo naturalista A. C. Brade, de 18 de abril à 24 de maio de 1951. **Rodriguésia**, São José do Rio Preto, v. 26, p. 55-66, 1951.
- COLLI, A. M. T.; SOUZA, S. A. de; SILVA, R. T. da. Pteridófitas do Parque Estadual de Porto Ferreira (SP), Brasil. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 29-36, 2003.
- ESTEVES, L. M.; MELHEM, T. S. Morfologia de esporos de pteridófitas do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu (SP). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 73-83, 1992.
- GRAÇANO, D.; PRADO, J.; AZEVEDO, A. A. Levantamento preliminar de Pteridophyta do Parque Estadual do Rio Doce (MG). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 165-182, 1998.
- HIRAI, R. Y.; PRADO, J. Selaginellaceae Willk. no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 313-339, 2000.
- LABIAK, P. H.; PRADO, J. Pteridófitas epífitas da Reserva Volta Velha, Itapoá – Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 11, p. 1-79, 1998.
- PEREIRA-NORONHA, M. R. **Formas de vida e reprodução em pteridófitas**. 1989. 272 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.
- PRADO, J. Pteridófitas do Estado de São Paulo. In: BICUDO, C. E. de M.; SHEPHERD, G. J. (Ed.). **Fungos macroscópicos e plantas do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, 1998. cap. 5, p. 49-61. (Série Biodiversidade do Estado de São Paulo, v. 2).
- \_\_\_\_\_.; LABIAK, P. H. Lista de pteridófitas da Serra da Juréia, município de Iguape, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 15, p. 83-85, 2001.
- RANAL, M. A. Estabelecimento de pteridófitas em mata mesófila semidecídua do Estado de São Paulo. 2. Natureza dos Substratos. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 583-594, 1995.
- SALINO, A. **Flora pteridofítica das matas ciliares da bacia do rio Jacaré-Pepira, Estado de São Paulo, Brasil**. 1993. 277 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- \_\_\_\_\_. Levantamento das pteridófitas da Serra do Cuscuzeiro, Analândia, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-178, 1996.
- SIMABUKURO, E. A.; ESTEVES, L. M.; FELIPPE, G. M. Fotoblastismo de pteridófitas de mata ciliar. **Insula**, Florianópolis, n. 22, p. 177-186, 1994a.
- \_\_\_\_\_. Lista de pteridófitas da mata ciliar da Reserva Biológica de Moji Guaçu, SP. **Insula**, Florianópolis, n. 23, p. 91-98, 1994b.
- SIQUEIRA, C. R.; WINDISCH, P. G. Pteridófitas da Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil: Dennstaedtiaceae. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 357-365, 1998, Suplemento.

TABANEZ, M. F.; ROSA, P. R. F. da. Projeto para implantação de área de educação ambiental e recreação na Floresta de Bebedouro – Bebedouro – São Paulo. In: \_\_\_\_\_. **Programa Nacional do Meio Ambiente**. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1994.

TRYON, R. Biogeography of species, with special reference to ferns. **Botanical Review**, New York, v. 52, n. 2, p. 117-156, 1986.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. **Ferns and allied plants, with special reference to Tropical America**. New York: Spring Verlag, 1982. 300 p.

WINDISCH, P. G. **Pteridófitas da região norte-ocidental do Estado de São Paulo**: guia para estudo e excursões. 2. ed. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 1992. 200 p.

# ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL EM POPULAÇÕES DE *Tabebuia cassinoides* POR LOCOS ISOENZIMÁTICOS<sup>1</sup>

Mário CAVALLARI NETO<sup>2</sup>  
Alexandre Magno SEBBENN<sup>3</sup>  
Carlos Eduardo Sícoli SEOANE<sup>4</sup>  
Paulo Yoshio KAGEYAMA<sup>2</sup>

## RESUMO

Marcadores isoenzimáticos foram usados para caracterizar a estrutura genética espacial de uma espécie arbórea tropical de alta densidade populacional, *Tabebuia cassinoides* (> 300 árvores por ha), em uma população natural e uma manejada da região do Vale do Ribeira, do Estado de São Paulo, Brasil. A hipótese de estrutura genética espacial foi avaliada para árvores adultas, usando dois diferentes métodos: estatísticas  $F$  e estimativas do coeficiente de coancestria entre pares de indivíduos por diferentes classes de distância. A divergência genética entre as populações foi baixa e não significativa ( $\hat{\theta}_p = 0,015$ ,  $P > 0,05$ ), indicando que 98,5% da diversidade genética se encontra dentro das populações. A divergência genética entre subpopulações dentro de populações ( $\hat{\theta}_{sp}$ ) foi significativa e acomodou de 2,9% a 8,6% da diversidade genética total. A divergência genética entre grupos dentro de subpopulações foi alta e estatisticamente diferente de zero para as populações natural ( $\hat{\theta}_g = 0,122$ ,  $P < 0,01$ ) e manejada ( $\hat{\theta}_g = 0,093$ ,  $P < 0,05$ ), sugerindo estrutura genética espacial dentro das populações. Numa das subpopulações manejadas, a da Fazenda Cindomel (CIN), foi detectado o mais alto e significativo coeficiente de coancestria entre árvores dentro de grupos ( $\hat{\theta}_g = 0,217$ ,  $P < 0,01$ ), indicando que árvores próximas são parentes entre si entre os graus de meios-irmãos e irmãos-completos. O coeficiente de coancestria ( $\hat{\theta}_{xy}$ ) estimado por classe de distância foi positivo e significativo entre a classe de distância de 90 m e 120 m na subpopulação JUN1, 105 m e 120 m na JUN3 e entre zero e 50 m e 120 m e 150 m na CIN, reforçando a hipótese de estrutura genética espacial.

Palavras-chave: *Tabebuia cassinoides*; espécies arbóreas tropicais; estrutura genética; coeficiente de coancestria; endogamia.

## ABSTRACT

Isozymes markers were used to evaluate the spatial genetic structure of a high-density tropical tree species *Tabebuia cassinoides* (> 300 trees per ha), in a natural and in an exploited forest stand, from Vale do Ribeira, State of São Paulo, Brazil. The spatial genetic structure hypothesis was evaluated for adult trees, using two different methods:  $F$ -statistics and coancestry coefficient in pairwise arranged individuals, estimated for different distance classes. The genetic divergence between populations was low and not significant ( $\hat{\theta}_p = 0.015$ ), indicating that the 98.5% of genetic diversity is within populations. The genetic divergence among subpopulations within populations ( $\hat{\theta}_{sp}$ ) was significant and holds 2.9% to 8.6% of the total genetic diversity. The genetic divergence among groups within subpopulations was high and statistically different from zero for both natural ( $\hat{\theta}_g = 0.122$ ;  $P < 0.01$ ) and exploited populations ( $\hat{\theta}_g = 0.093$ ,  $P < 0.01$ ), suggesting strong spatial genetic structure within populations. In the exploited subpopulations the highest and most significant coancestry coefficient among tree within groups was detected ( $\hat{\theta}_g = 0.217$ ,  $P < 0.01$ ), indicating that neighbor trees are parents in a level between half-sibs and full-sibs. The coancestry coefficient ( $\hat{\theta}_{xy}$ ) estimated per distance classes was positive and significant between 90 m and 120 m in JUN1 subpopulation, 105 m and 120 m in JUN3 and between zero and 50 m and 120 m and 150 m in CIN subpopulation, reinforcing the hypothesis of spatial genetic structure.

Key words: *Tabebuia cassinoides*; tropical tree species; genetic structure; coancestry coefficient; inbreeding.

(1) Aceito para a publicação em dezembro de 2004.

(2) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 15, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

(3) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

(4) Instituto Brasileiro de Recuperação Ambiental e Desenvolvimento Sustentável - IBRAS, Rua Ignez Peixoto, 565, cs7, 24346-070, Niterói, RJ, Brasil.

## 1 INTRODUÇÃO

A distribuição espacial da variação genética dentro e entre populações é o resultado do fluxo gênico, deriva genética e seleção natural (Loiselle *et al.*, 1995). A distribuição genética espacial dentro de populações é determinada, primariamente, por efeitos de fatores como limitada dispersão de pólen e sementes, isolamento de pequenas manchas, mortalidade diferencial e seleção para microhabitat (Epperson, 1993). Mesmo moderados limites de dispersão de sementes podem causar estruturação espacial de genótipos ou isolamento por distância dentro de populações e subsequente endogamia biparental. A estrutura genética espacial e a taxa de cruzamento são os principais fatores controlando o sistema de reprodução, os níveis de endogamia e mesmo a dinâmica da variação genética dentro de populações de plantas. Esses fatores também interagem com a seleção natural por meio da depressão por endogamia (Epperson & Chung, 2001).

*Tabebuia cassinoides* (Lam.) Can. – caixeta – é uma espécie arbórea tropical que foi muito explorada no passado, principalmente para a produção de lápis, tamancos, saltos de sapatos e artesanatos (Carvalho, 1994). Endêmica da Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica), nas formações Terras Baixas, Baixo-Montana e Pioneiras de influência pluvial (Lorenzi, 1998), *T. cassinoides* ocorre com alta densidade demográfica (> 300 árvores por ha) em locais brejosos e encharcados ao longo da costa brasileira, entre os Estados de Pernambuco (08°S) e Santa Catarina (26°S). Suas flores são hermafroditas e polinizadas principalmente por abelhas (Carvalho, 1994) e a reprodução ocorre por combinação parcial de autofecundações com predomínio de cruzamentos (Sebbenn *et al.*, 2000). Os frutos são do tipo síliqua estriada de 13 a 20 cm de comprimento, com numerosas sementes, dispersas pelo vento (anemocoria) e pela água (hidrocoria) (Carvalho, 1994), de forma que muitas sementes são depositadas e germinam nas vizinhanças da árvore materna, favorecendo a formação de estrutura genética espacial dentro das populações. Adicionalmente, sua reprodução inclui a propagação vegetativa por raízes geminíferas, o que também contribui para formação de estrutura genética espacial dentro das populações. Índícios de estrutura genética espacial, em populações de *T. cassinoides*, foram detectados em estudo do sistema de reprodução.

Sebbenn *et al.* (2000) observaram taxa de cruzamento entre indivíduos parentes ( $t_m - t_s$ ) de até 17,5% em uma população natural. Cruzamentos entre parentes, juntamente com autofecundações, são as duas formas de geração de endogamia em espécies monóicas autocompatíveis. Contudo, até o presente, não existem estudos avaliando a distribuição espacial de genótipos de *T. cassinoides* em populações naturais, mas acredita-se que devido a suas características de dispersão de sementes próximas à árvore materna e reprodução assexuada por raízes geminíferas, suas populações apresentem forte estrutura genética espacial.

A estrutura genética espacial pode ser estudada por métodos de análise de autocorrelação espacial. As análises de autocorrelação espacial, como o índice *I* de Moran, são particularmente informativas, devido a estes métodos incluírem comparações de todos os pares de indivíduos na amostra e, assim, terem alto poder estatístico (Epperson, 1990). Outros métodos para o estudo da estrutura genética espacial incluem as estatísticas *F* e a estimativa do coeficiente de coancestria por classe de distância (Loiselle *et al.*, 1995). Este último método é particularmente interessante por fazer inferência à identidade por descendência dos alelos. Em um modelo de isolamento por distância, em que se espera que indivíduos espacialmente próximos sejam mais correlacionados entre si do que os distantes, pode-se esperar que a estimativa da coancestria decline gradualmente entre pares de indivíduos localizados espacialmente próximos para os de longas distâncias geográficas (Loiselle *et al.*, 1995). As estatísticas *F* também podem ser usadas para o estudo da distribuição espacial de genótipos quando grupos são estabelecidos dentro das populações, de forma que é possível determinar a divergência genética entre grupos, a partir do parentesco entre pares de indivíduos dentro dos grupos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura genética espacial dentro de populações de *T. cassinoides*, usando estatísticas *F* e a estimativa do coeficiente de coancestria por classes de distância. Para tanto, foram amostradas cinco subpopulações de duas populações da espécie, sendo três subpopulações de uma população natural e duas subpopulações de uma manejada, todas do Vale do Ribeira, sudoeste do Estado de São Paulo, onde *T. cassinoides* é explorada por comunidades locais com fins econômicos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização das Áreas de Estudo

O estudo da distribuição espacial de genótipos de *T. cassinoides* foi realizado em cinco subpopulações de duas populações da região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, sendo três subpopulações naturais (JUN1, JUN2 e JUN3), localizadas na Estação Ecológica de Juréia-Itatins e duas subpopulações exploradas (CIN e RET), em propriedades particulares, uma na Fazenda Cindomel e outra na Fazenda Retiro, próximas ao município de Iguape. Esses locais foram escolhidos justamente por representarem dois diferentes quadros, populações naturais e manejadas, assim é possível compará-las e avaliar os efeitos antrópicos nas populações da espécie. A Estação Ecológica de Juréia-Itatins compreende uma área de aproximadamente 79.270 ha, na faixa litorânea do Estado de São Paulo, entre os municípios de Iguape e Peruíbe (Mantovani, 1993).

O caixetal Juréia compreende uma população grande e contínua, podendo-se observar árvores com DAP (diâmetro à altura do peito) maior que 30 cm. Nessa área não existem relatos de exploração e, por isso, foi considerada como uma população natural. Os caixetais Cindomel e Retiro encontram-se distantes entre si em aproximadamente 2 km, 20 km distantes do município de Iguape e 40 km da população Juréia. A Fazenda Cindomel situa-se nas coordenadas 24°23'S e 47°33'W. A área total da fazenda é de 2.720 ha, sendo que o caixetal amostrado (CIN) ocupa 40 ha. Esse caixetal foi intensamente manejado em 1985 e 1999. A exploração em 1999 excluiu todas as árvores com DAP maior que 15 cm, visto que em 2002, ano da amostragem para este estudo, não foram detectadas árvores com DAP maior do que 15 cm. As árvores amostradas representavam condução de brotação após o manejo. A Fazenda Retiro está compreendida entre as coordenadas 24°34'S e 47°33'W, às margens da Rodovia SP-222. A área total é de 180 ha, onde o caixetal ocupa apenas 15 ha. Informações sobre a primeira intervenção de extração de caules de caixeta datam de 1969, sendo que a segunda intervenção ocorreu depois de 1994. Nessa população também não foram observadas árvores com DAP maior que 15 cm.

### 2.2 Amostragem

Em novembro de 2002 foram amostradas 340 árvores adultas (> 10 cm de DAP) de *T. cassinoides* em cinco subpopulações. A distância entre as subpopulações da população natural Juréia variou de 2 km (JUN1 e JUN3) a 13 km (JUN2 e JUN3) e a distância entre as subpopulações manejadas CIN e RET foi de 2 km. Em cada subpopulação procurou-se amostrar pelo menos 60 árvores adultas, com exceção da população JUN3, onde 100 árvores foram amostradas. Para avaliar a possível existência de estruturação genética espacial dentro das subpopulações, usando as estatísticas *F*, os indivíduos foram amostrados em pequenos grupos aleatórios, constituídos pelas cinco árvores mais próximas entre si. A distância entre as árvores dentro dos grupos variou de 2 m a 15 m e a distância entre os grupos variou de 20 m a 70 m. Foram feitos 12 grupos aleatórios dentro das subpopulações, com exceção da subpopulação JUN2, onde foram feitos 20 grupos aleatórios. De cada árvore amostrada foi retirada uma pequena quantidade de tecido foliar e registrada a sua localização geográfica, utilizando-se um aparelho de localização geográfica (GPS). Os tecidos coletados foram armazenados em recipientes com gelo, no mesmo dia foram transportados para o laboratório e armazenados em geladeira a 5°C para posterior extração das isoenzimas e análise de eletroforese.

### 2.3 Eletroforese de Isoenzimas

A extração das isoenzimas das folhas foi efetuada usando o tampão de extração número um (1) citado em Alfenas (1998). Após a maceração de pequena porção de tecido foliar de cada indivíduo (aproximadamente 4 cm<sup>2</sup>), adicionada de 3 µl de tampão de extração, o extrato resultante era absorvido em papel Whatman n° 3 (dimensões de 0,5 x 2,0 cm), colocado em microtubos e armazenado em freezer (-80°C), onde aguardava o momento da realização da eletroforese.

A eletroforese foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho e amido de batata, na proporção 2:1 e 13% de concentração. O tampão de cuba e gel utilizado foi o Histidina pH 6.6, alterado de Morden *et al.* (1988), que usaram pH 6.5. As “corridas” foram realizadas em geladeira com temperatura de 5°C, mantendo a corrente constante nos eletrodos em 35 miliampères. O tempo de eletroforese era de aproximadamente cinco horas. Depois, os géis eram fatiados em cinco camadas, sendo excluída a fatia superior e as isoenzimas resolvidas nas quatro restantes. Os géis foram resolvidos em oito sistemas isoenzimáticos: Malato Desidrogenase (MDH-E.C. 1.1.1.37), Fosfoglucoase Isomerase (PGI-E.C. 5.3.1.9), Fosfoglucomutase (PGM-E.C. 2.7.5.1), Leucina aminopeptidase (LAP-E.C. 3.4.11.1), Isocitrato Desidrogenase (IDH-E.C. 1.1.1.42), Xiquimato Desidrogenase (SKDH-E.C. 1.1.1.25), Alfa-Esterase ( $\alpha$ -EST-E.C. 3.1.1.1) e 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH-E.C. 1.1.1.44). As receitas e o protocolo de revelação das isoenzimas são os mesmos descritos por Alfenas (1998).

## 2.4 Análise Estatística

Com o intuito de conhecer a distribuição espacial dos genótipos de *T. cassinoides* dentro das subpopulações, conduziu-se duas diferentes formas de análise: *i*) análises das estatísticas *F* da distribuição da diversidade genética entre e dentro de grupos de árvores dentro de subpopulações, e *ii*) estimativa do coeficiente de coancestria ( $\hat{\theta}_{xy}$ ) entre pares de indivíduos por classe de distâncias. As estatísticas *F* foram realizadas segundo metodologia de Weir & Cockerham (1984). Os parâmetros estimados foram: divergência genética entre grupos dentro de subpopulações ( $\hat{\theta}_g$ ), entre subpopulações dentro de população ( $\hat{\theta}_{sp}$ ) e entre populações ( $\hat{\theta}_p$ ), índice de fixação total das subpopulações e populações ( $\hat{F}$ ) e, índice de fixação médio dentro da subpopulações e populações ( $\hat{f}$ ). As estatísticas *F* e os testes de significância das estimativas, obtidos pelo intervalo de confiança a 95% e 99% de probabilidade, usando 10.000 reamostragens *bootstraps*, foram calculadas usando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 1999).

A estimativa do coeficiente de coancestria ( $\hat{\theta}_{xy}$ ) entre pares de árvores por classes de distância foi realizada segundo método descrito por Loiselle *et al.* (1995), definida para cada *k* alelo em cada par de indivíduos, *x* e *y*, como,

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{(p_x - \bar{p}_k)(p_y - \bar{p}_k)}{\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)} + \frac{1}{n-1}$$

em que,  $p_x$  e  $p_y$  são as frequências do alelo *k* nos indivíduos *x* e *y* (assumindo valores de 0, 0,5 e 1 em indivíduos homocigotos para o alelo alternativo, heterocigotos e homocigotos para o alelo sob consideração, respectivamente) e  $\bar{p}_k$  é a média da frequência do alelo *k* na subpopulação com tamanho amostral *n*. As estimativas da média multiloco foram calculadas pela ponderação de  $\hat{\theta}_{xy}$  em função do índice de polimorfismo de cada alelo  $\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)$ . O intervalo de confiança a 95% de probabilidade (1,96EP) do coeficiente médio de coancestria foi estimado para cada classe de distância com base no erro padrão (EP) da média das estimativas, obtido por reamostragem *jackknifed* entre locos. O coeficiente de coancestria e o erro padrão foram estimados usando o programa SPAGeDi versão 1.1 (Hardy & Vekemans, 2003).

As classes de distância foram criadas com base no critério de distâncias iguais entre classes. Como a distância espacial entre árvores amostradas diferiu entre as subpopulações, foram criadas diferentes classes de distância nas subpopulações. Nas subpopulações JUN1, JUN2 e CIN foram criadas oito classes de distância (0 a 30 m, 30 a 60 m, 60 a 90 m, 90 a 120 m, 120 a 150 m, 150 a 180 m, 180 a 210 m e 210 a 240 m), na subpopulação JUN3 foram criadas dez classes de distância (0 a 15 m, 15 a 30 m, 30 a 45 m, 45 a 60 m, 60 a 75 m, 75 a 90 m, 90 a 105 m, 105 a 120 m, 120 a 135 m e 135 a 150 m) e oito na subpopulação RET (0 a 10 m, 10 a 20 m, 20 a 30 m, 30 a 40 m, 40 a 50 m, 50 a 60 m, 60 a 70 m e 70 a 80 m).

### 3 RESULTADOS

A análise da distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações pela estatística  $F$  (TABELA 1) detectou baixa e não significativa divergência genética entre as populações natural e manejada ( $\hat{\theta}_p = 0,015$ ,  $P > 0,05$ ). A divergência genética entre todas as subpopulações (naturais + manejadas) foi relativamente alta e significativa ( $\hat{\theta}_{sp} = 0,084$ ,  $P < 0,01$ ).

O desdobramento dessa divergência total entre subpopulações revelou, igualmente, divergência genética significativa entre as subpopulações naturais ( $\hat{\theta}_{sp} = 0,086$ ,  $P < 0,01$ ) e manejadas ( $\hat{\theta}_{sp} = 0,029$ ,  $P < 0,01$ ). Em resumo, não existe divergência genética entre as populações naturais e manejadas, mas existem diferenças genéticas entre as subpopulações dentro destas.

TABELA 1 – Estimativas das estatísticas  $F$ , em amostras estruturadas de *Tabebuia cassinoides*.

Amostra	$n_p[n_{sp}](n_g)$	$\hat{f}$	$\hat{F}$	$\hat{\theta}_g$	$\hat{\theta}_{sp}$	$\hat{\theta}_p$
Populações	2[5](68)	–	0,154**	0,126**	0,084**	0,015
Subpopulações Naturais	[3](44)	-0,031	0,095**	0,122**	0,086**	
JUN1	(12)	–	-0,159**	0,007		
JUN2	(20)	–	0,134	0,089		
JUN3	(12)	–	0,077	0,003		
Subpopulações Manejadas	[2](24)	0,130	0,211**	0,093*	0,029**	
CIN	(12)	–	0,330**	0,217**		
RET	(12)	–	0,136	-0,024*		

$n_p$ ,  $n_{sp}$  e  $n_g$  são os números de populações e subpopulações, respectivamente.

$\hat{f}$  e  $\hat{F}$  são os índices de fixação médio e total dentro das subpopulações e populações, respectivamente.

$\hat{\theta}_g$ ,  $\hat{\theta}_{sp}$  e  $\hat{\theta}_p$  são a divergência genética entre grupos dentro de subpopulações, entre subpopulações e entre populações, respectivamente.

(\*)  $P < 0,05$ .

(\*\*)  $P < 0,01$ .

A análise da distribuição espacial de genótipos a partir das estatísticas  $F$  (TABELA 1) detectou coancestria alta e significativa entre indivíduos dentro dos grupos, na análise conjunta das populações ( $\hat{\theta}_g = 0,126$ ,  $P < 0,01$ ) e na análise individual das subpopulações naturais ( $\hat{\theta}_g = 0,122$ ,  $P < 0,01$ ) e manejadas ( $\hat{\theta}_g = 0,093$ ,  $P < 0,05$ ), sugerindo forte estruturação genética espacial nas populações de *T. cassinoides*. Contudo, a análise individual das subpopulações naturais não detectou coancestrias significativas entre indivíduos dentro de grupos, embora a coancestria dentro de grupos

da subpopulação JUN2 tenha sido alta ( $\hat{\theta}_g = 0,089$ ). Nas outras duas subpopulações naturais foram detectados baixos e não significativos níveis de coancestria (JUN1 -  $\hat{\theta}_g = 0,007$ ; JUN3 -  $\hat{\theta}_g = 0,003$ ), sugerindo que indivíduos próximos não são parentes entre si. Dentro da população manejada, foram detectados fortes indícios de estruturação genética espacial na subpopulação CIN, com valores próximos ao esperado entre indivíduos irmãos-completos ( $\hat{\theta}_g = 0,217$ ,  $P < 0,01$ ). Por outro lado, na subpopulação manejada RET não foram detectados indícios de estrutura genética espacial ( $\hat{\theta}_g = -0,024$ ,  $P < 0,05$ ).

A estimativa do índice de fixação total foi positivo, alto e significativo para o conjunto das populações (naturais e manejadas) ( $\hat{F} = 0,154$ ,  $P < 0,01$ ), população natural ( $\hat{F} = 0,095$ ,  $P < 0,01$ ) e manejada ( $\hat{F} = 0,211$ ,  $P < 0,01$ ), sugerindo endogamia nas populações de *T. cassinoides* (TABELA 1). O índice de fixação médio das subpopulações naturais foi negativo e não significativo ( $\hat{f} = -0,031$ ), indicando ausência de endogamia nas subpopulações naturais. O índice de fixação individual das subpopulações naturais foi negativo e significativo na subpopulação JUN1 ( $\hat{F} = -0,159$ ,  $P < 0,01$ ), sugerindo excesso de heterozigotos e positivo e não significativo nas subpopulações JUN2 ( $\hat{F} = 0,134$ ) e JUN3 ( $\hat{F} = 0,077$ ), sugerindo ausência de endogamia. Por outro lado, o índice de fixação médio das subpopulações manejadas foi positivo e alto, mas não significativo ( $\hat{f} = 0,130$ ). Dentro das subpopulações manejadas o índice de

fixação foi positivo, alto e significativo na subpopulação CIN ( $\hat{F} = 0,330$ ,  $P < 0,01$ ), indicando endogamia e não significativo na RET ( $\hat{F} = 0,136$ ), indicando ausência de endogamia.

A caracterização da distribuição espacial de genótipos, a partir da estimativa do coeficiente de coancestria por classes de distância, dentro das subpopulações, detectou indícios de estrutura genética espacial nas subpopulações naturais JUN1 e JUN3 e na subpopulação manejada CIN (FIGURAS 1, 3 e 4, respectivamente). Na subpopulação JUN1 foi detectada coancestria significativa na classe de distância 90 a 120 m (FIGURA 1), na subpopulação JUN3, o coeficiente de coancestria foi positivo e significativo na classe de distância 105 a 120 m (FIGURA 3) e na subpopulação CIN foi detectado coeficiente de coancestria positivo e significativo entre a classe de distância de zero a 50 m e na de 120 a 150 m (FIGURA 4). Nas subpopulações JUN2 e RET não foram detectados indícios de estruturação genética espacial.

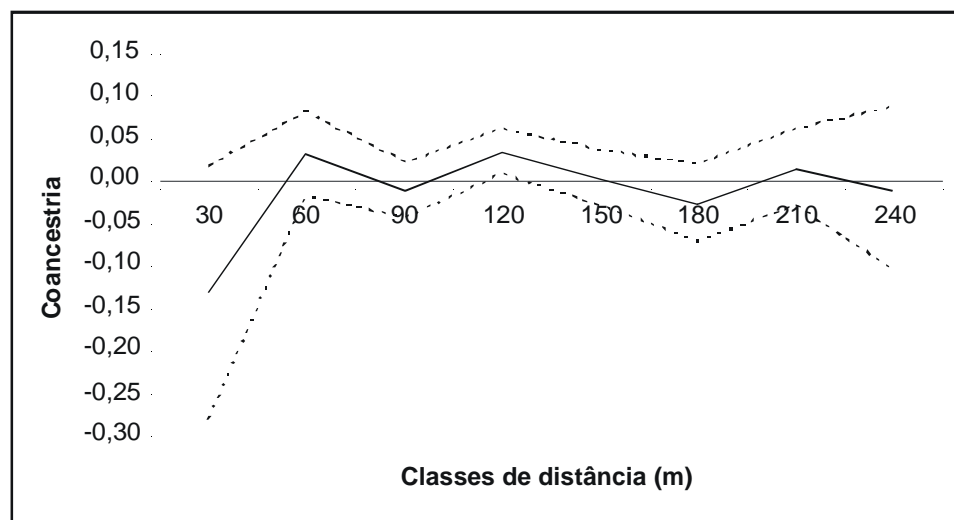


FIGURA 1 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população JUN1. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

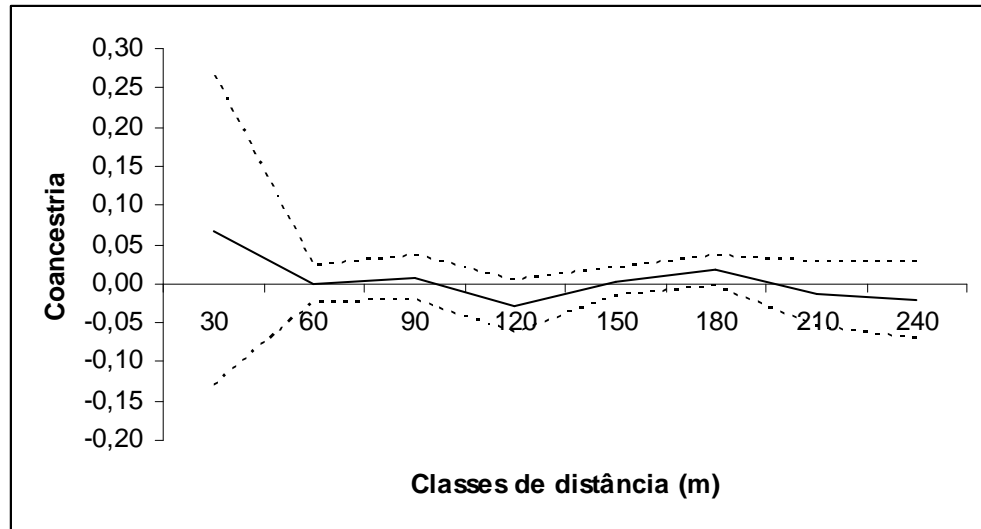


FIGURA 2 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população JUN2. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

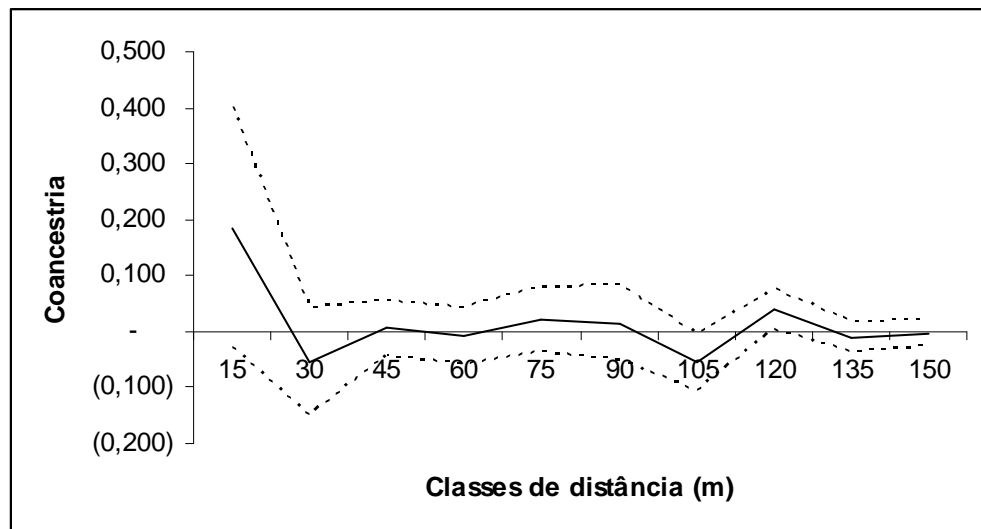


FIGURA 3 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população JUN3. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

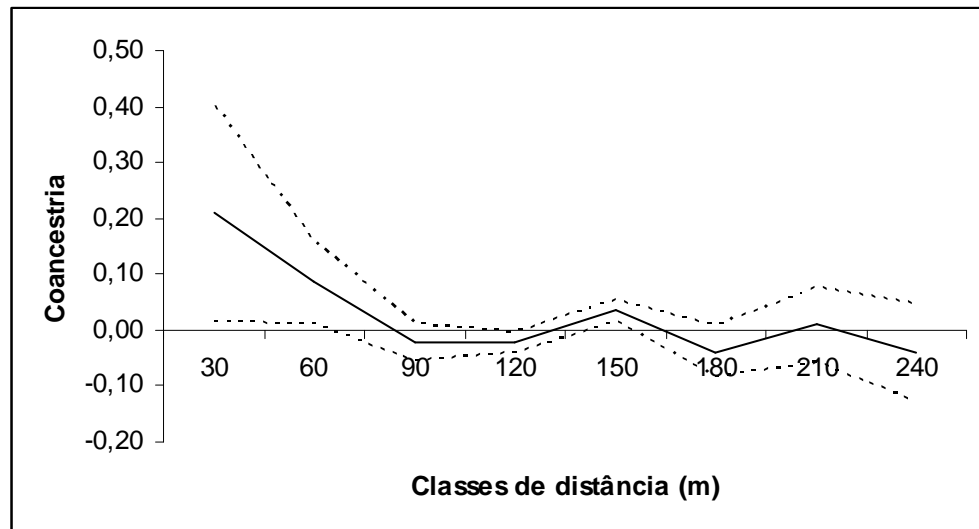


FIGURA 4 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população CIN. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

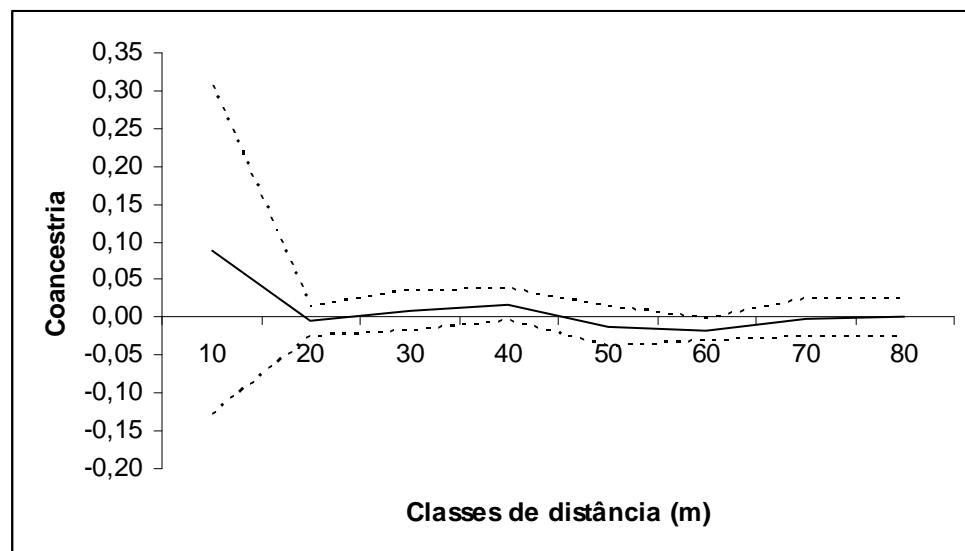


FIGURA 5 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população RET. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

#### 4 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a maior parte da diversidade genética se encontra distribuída dentro das populações de *T. cassinoides* (TABELA 1). A divergência genética entre populações ( $\hat{\theta}_p$ ) foi de 0,015, sugerindo que 98,5% da diversidade genética se encontra dentro das populações. Esse resultado já havia sido observado em prévio estudo da estrutura genética de populações de *T. cassinoides*, onde Sebbenn *et al.* (2001) detectaram divergência genética de 0,047 para árvores adultas e 0,039 para estruturas de progênies, entre duas populações, uma natural (Juréia) e uma manejada (Fazenda Retiro). Embora essas populações estejam distantes entre si aproximadamente 40 km, e representem dois quadros diferentes de intervenção antrópica (uma população natural e uma manejada), os resultados indicam que ambas compartilham o mesmo conjunto gênico. A causa é, provavelmente, o forte fluxo gênico que ocorreu no passado (fluxo gênico remoto), há mais de 100 anos, quando essas populações faziam parte de uma floresta contínua. Outro fator que provavelmente contribuiu para a baixa diferenciação é a sua alta densidade populacional (> 300 árvores/ha). Devido a isso, a exclusão, pelo manejo, de parte dos indivíduos da população Iguape não foi suficiente, até o momento, para alterar drasticamente as frequências alélicas entre as populações.

A diversidade genética dentro das populações de *T. cassinoides* encontra-se altamente estruturada. A divergência genética entre as subpopulações foi alta e significativa na análise conjunta das populações natural e manejada ( $\hat{\theta}_{sp} = 0,084$ ) e na análise individual da população natural ( $\hat{\theta}_{sp} = 0,086$ ). A divergência genética entre as subpopulações manejadas foi baixa, mas significativa ( $\hat{\theta}_{sp} = 0,029$ ). A menor divergência genética entre as subpopulações manejadas, em comparação com as subpopulações naturais, pode ser explicada, principalmente, pela distância que separa estas subpopulações. As subpopulações da população natural Juréia encontram-se distantes entre si, de 2 a 13 km (11 km entre JUN1 e JUN2, 2 km entre JUN1 e JUN3 e 13 km entre JUN2 e JUN3), enquanto as subpopulações da população manejada encontram-se distantes entre si, aproximadamente 2 km.

A menor distância entre as subpopulações manejadas e a ocorrência de poucas subpopulações nas redondezas dessas favorecem o fluxo gênico preferencial entre elas, homogeneizando a diversidade genética intrasubpopulacional e reduzindo a divergência genética entre subpopulações.

A análise da distribuição espacial dos genótipos de *T. cassinoides*, usando as estatísticas *F*, indicou forte estrutura genética espacial dentro das populações. A medida de divergência genética entre grupos dentro de subpopulações ( $\hat{\theta}_g$ ), que mede a diferença entre grupos a partir do coeficiente de coancestria médio entre árvores dentro dos grupos ou, em outros termos, mede a probabilidade de amostrar-se dois alelos em duas árvores de um mesmo grupo e eles serem idênticos por descendência, foi alta e significativa tanto quando as populações natural e manejada foram analisadas simultaneamente ( $\hat{\theta}_g = 0,126$ ), como quando analisadas isoladamente (população natural:  $\hat{\theta}_g = 0,122$ ; manejada  $\hat{\theta}_g = 0,093$ ), indicando que árvores próximas podem ser parentes. A magnitude do coeficiente de coancestria entre plantas dentro de grupos, obtido da análise conjunta das populações (0,126) e da análise da população natural (0,122), foi próxima à esperada entre indivíduos meios-irmãos (0,125). Na população manejada, o coeficiente de coancestria foi um pouco menor (0,093), provavelmente devido à exploração, que retirou parte dos indivíduos e, assim, reduziu a estrutura genética espacial. O alto parentesco entre árvores próximas sugere que a dispersão de sementes e o recrutamento ocorrem nas vizinhanças das árvores matrizes. Como consequência pode-se esperar a ocorrência de cruzamento entre parentes nas populações e a geração de endogamia biparental, adicionalmente, a autofecundação. Sebbenn *et al.* (2000) comparando o sistema de reprodução na subpopulação RET e em uma amostra da população Juréia observaram maior taxa de cruzamento entre parentes na população natural (17,5%), relativamente à população manejada (9,2%). Os autores atribuíram a maior proporção de cruzamentos entre indivíduos parentes na população natural à possível estruturação genética espacial, o que o presente trabalho está reforçando, e a menor proporção na população manejada devido à exclusão de genótipos pela exploração.

Embora a redução da estrutura genética espacial seja um aspecto positivo do manejo, visto que o cruzamento entre parentes é uma das duas formas de geração de endogamia em espécies hermafroditas autocompatíveis como *T. cassinoides*, os autores detectaram que a taxa de autofecundação foi maior na população manejada (21,7%) em comparação à natural (10,5%), atribuindo o fenômeno ao aumento da distância espacial entre os indivíduos dentro das populações. Estudos do sistema de reprodução em espécies arbóreas, comparando diferentes densidades de florescimento e indivíduos por população, têm detectado a tendência de populações, com menor densidade de flores (Murawski & Hamrick, 1991) e menor densidade populacional (Fuchs *et al.*, 2002) de apresentarem maior taxa de autofecundação, relativamente a populações com maior densidade de florescimento e maior número de indivíduos por área. Em termos genéticos, a autofecundação tem um efeito mais drástico para geração de endogamia do que o cruzamento entre parentes, por aumentar a endogamia em 50% a cada geração, enquanto o cruzamento entre parentes aumenta a endogamia em proporção igual ao coeficiente de coancestria entre os indivíduos que estão se cruzando. Por exemplo, a endogamia gerada na descendência do cruzamento entre dois indivíduos meios-irmãos é 12,5%, do cruzamento de dois irmãos-completos é de 25% e da autofecundação de uma planta de 50% (Sebbenn, 2003).

*T. cassinoides*, muitas vezes, propaga-se por raízes geminíferas de forma a incluir clones nas populações, o que naturalmente favorece a ocorrência de estruturação genética espacial e pode predispor à ocorrência de cruzamento entre clones. O cruzamento entre clones idênticos tem a mesma consequência que a autofecundação, ou seja, aumenta a endogamia em 50% na descendência. As consequências da endogamia em espécies arbóreas, predominantemente de cruzamento, são conhecidas por reduzirem a produtividade, fertilidade, crescimento e adaptação (Sorensen & Miles, 1982; Durel *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1998). No entanto, não existem estudos dos seus efeitos em *T. cassinoides*, mas acredita-se que esses efeitos sejam, no mínimo, similares ao encontrados em outras espécies arbóreas. Contudo, durante o processo de amostragem, tomou-se o cuidado de não se coletar amostras de indivíduos clones e a

estrutura genética espacial detectada deve estar refletindo a existência de parentesco dentro das subpopulações, embora não se descarte a possibilidade de alguns indivíduos amostrados serem clones. Ainda, caso a amostra tivesse incluído muitos clones, o coeficiente de coancestria deveria assumir valores próximo a 0,5, o que não é o caso, em nenhuma das subpopulações amostradas.

Diversos estudos têm detectado estrutura genética espacial dentro de populações de espécies arbóreas tropicais (Sebbenn *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999; Chung & Epperson, 2000; Giudice-Neto & Kageyama, 2000; Dutuch *et al.*, 2002). Em praticamente todos os estudos, a estrutura genética espacial foi atribuída à dispersão de sementes nas vizinhanças da árvore matriz.

A forte estruturação genética espacial observada na subpopulação CIN ficou evidenciada nos dois métodos de análise, em que se verifica que árvores localizadas até a distância de aproximadamente 50 m, e entre 120 m e 150 m, apresentaram valores positivos e significativos para o coeficiente de coancestria estimado com base no modelo de Loiselle *et al.* (1995), a julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade (FIGURA 4). A forte estruturação detectada na subpopulação CIN também ficou evidente na análise baseada nas estatísticas *F*, em que se detectou que a divergência genética entre grupos dentro da subpopulação era 0,217, a mais alta detectada neste estudo (TABELA 1). Assim, interpretando a medida de divergência como um coeficiente de coancestria, verifica-se que o parentesco dentro das subpopulações encontra-se próximo ao esperado em progênies de irmãos-completos (0,250). Conseqüentemente, pode-se esperar o aparecimento de endogamia biparental na descendência dessa população de aproximadamente 0,217 a cada geração. Observando o índice de fixação para o total dessa subpopulação ( $\hat{F}$ ), já é possível observar forte e significativa endogamia (0,330) e como consequência, pode-se esperar a ocorrência de depressão por endogamia. Segundo (Allard, 1971), em populações de espécies alógamas, como o caso de *T. cassinoides*, onde todas as plantas são altamente heterozigotas, a presença de endogamia leva a uma deterioração geral do vigor, bem como ao aparecimento de efeitos adversos como a perda de fertilidade, adaptação, produtividade, etc., fenômeno este conhecido por depressão endogâmica.

Nas subpopulações JUN2 e RET (FIGURAS 2 e 5) não foram detectados indícios de estruturação genética espacial, por nenhum dos métodos de análise, sugerindo ausência ou baixo parentesco dentro delas. Em concordância, nessas subpopulações, embora os índices de fixação tenham sido positivos, eles não foram estatisticamente diferentes de zero, sugerindo ausência de endogamia.

Os dois métodos utilizados para avaliar a estrutura genética espacial de *T. cassinoides* foram eficientes para descrever a distribuição espacial de genótipos dentro das populações. Os resultados, embora obtidos por métodos diferentes, em muitos momentos são concordantes em termos de tendência. Por exemplo, as estatísticas *F* detectaram forte e significativa estruturação dentro dos grupos na subpopulação CIN (0,217), sugerindo que indivíduos espacialmente próximos (dentro dos grupos) são parentes entre si no grau de irmãos-completos (0,25). Igualmente, a estimativa do coeficiente de coancestria, por classe de distância, detectou valores positivos e significativos até a classe de distância de 50 m e valor (0,210) próximo ao esperado em indivíduos irmãos-completos (0,250). Ainda, a análise individual das subpopulações JUN1, JUN2, JUN3 e RET, pelas estatísticas *F* e estimativa do coeficiente de coancestria por classe de distância não detectaram indícios de estrutura genética espacial entre árvores próximas (TABELA 1 e FIGURAS 1, 2, 3 e 5). Esses resultados demonstram uma complementação entre os métodos. Porém, a não detecção de estrutura dentro dos grupos na análise individual das subpopulações, mas detecção na análise conjunta das subpopulações e populações, é provavelmente fruto do tamanho amostral reduzido entre (12 e 20 grupos) e dentro de grupos (5 árvores).

Em suma, os resultados demonstram que algumas populações de *T. cassinoides* apresentam forte estrutura genética espacial, que o parentesco entre árvores próximas pode ser alto e que a endogamia detectada pode ser, em parte, fruto do cruzamento entre indivíduos parentes. Também foram observados indícios de que o manejo pode, em termos, se bem delineado, ser benéfico para a dinâmica da endogamia entre gerações, reduzindo a estrutura genética espacial pela exclusão de genótipos parentes, localizados espacialmente próximos e, conseqüentemente, reduzindo a probabilidade de ocorrerem cruzamentos entre parentes.

## 5 CONCLUSÕES

- Não existe divergência genética entre as populações natural e manejada.
- Algumas populações apresentam estruturação genética espacial.
- O parentesco dentro de populações de *T. cassinoides* pode atingir patamares próximos ao esperado em progênies de irmãos-completos.

## 6 AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos aos funcionários da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, Rui Aparecido e Dauro Prado de Marco, pelo suporte logístico e auxílio na amostragem de campo; ao Técnico de Apoio à Pesquisa, Carlos Eduardo Spósito, pela correção do artigo, e à Assistente Técnica de Pesquisa Científica e Tecnológica, Yara Cristina Marcondes, pela revisão gramatical. O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo - FAPESP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins:** fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 574 p.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras:** recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.
- CHUNG, M. G.; CHUNG, J. M.; EPPERSON, B. K. Spatial structure of allozyme polymorphisms within populations of *Rhus trichocarpa* (Anacardiaceae). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 48, p. 223-227, 1999.
- \_\_\_\_\_.; EPPERSON, B. K. Spatial structure of allozyme polymorphisms in a populations of *Eurya japonica* (Theaceae). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 1-4, 2000.

- DUREL, C. E.; BERTIN, P.; KREMER, A. Relationship between inbreeding depression and inbreeding coefficient in Maritime Pine (*Pinus pinaster*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 341-350, 1990.
- DUTECH, C. *et al.* Evidence of low gene flow in a neotropical clustered tree species in two rainforest stands of French Guiana. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v. 11, p. 725-738, 2002.
- EPPERSON, B. K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A. H. D. *et al.* (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 229-253.
- \_\_\_\_\_. Recent advances in correlation studies of spatial patterns of genetic variations. **Evolutionary Biology**, Manchester, v. 27, p. 95-155, 1993.
- \_\_\_\_\_.; CHUNG, M. G. Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms within populations of *Pinus strobus* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, Oklahoma, v. 88, n. 6, p. 1006-1010, 2001.
- FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, San Francisco, v. 17, p. 149-157, 2002.
- GIUDICE-NETO, J. D.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Machaerium villosum* Vog. (Leguminosae) na região de Moji-Guaçu, SP, Brasil. **Rev. Bras. de Bot.**, São Paulo, v. 23, p. 207-215, 2000.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. **SPAGeDI 1.1**: a program for spatial pattern analysis of genetic diversity. Version for Windows 95. Disponível em: <www.ulb.ac.be/sciences/ecovol/software>. Acesso em: 11 out. 2003.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **GDA - Genetic Data Analysis**: version 1.1 for Windows 95/NT. Disponível em: <http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>. Acesso em: 22 mar. 1999.
- LOISELLE, B. A. *et al.* Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Oklahoma, v. 82, p. 1420-1425, 1995.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 252 p.
- MANTOVANI, W. **Estrutura e dinâmica da floresta Atlântica na Juréia, Iguape**. 1993. 126 f. Tese (Livre Docência em Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MORDEN, C. W.; DOEBLEY, J. F.; SCHERTZ, K. F. Genetic control and subcellular localization of acorn amylase isozymes in *Sorghum*. **Journal of Heredity**, Cary, v. 79, p. 294-299, 1988.
- MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individual on the mating systems of nine tropical tree species. **Hereditas**, Lund, v. 67, p. 167-174, 1991.
- SEBBENN, A. M. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 109-124, 2003.
- \_\_\_\_\_.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 53, p. 15-30, 1998.
- \_\_\_\_\_. *et al.* Efeitos do manejo florestal sobre a estrutura genética de caixeta - *Tabebuia cassinoides*, no Vale do Ribeira, SP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 58, p. 127-143, 2000.
- \_\_\_\_\_. *et al.* Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 99-113, 2001.
- SORENSEN, F. C.; MILES, R. Inbreeding depression in high, height growth and survival of Douglas-Fir, Ponderosa Pine, and Noble Fir to 10 years of age. **Forest Science**, Washington, D.C., v. 28, n. 2, p. 283-292, 1982.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- WU, H. X.; MATHESON, A. C.; SPENCER, D. Inbreeding in *Pinus radiata*. 1. The effect of inbreeding on growth, survival and variance. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 1256-1268, 1998.