

# ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Tabebuia cassinoides*: IMPLICAÇÕES PARA O MANEJO FLORESTAL E A CONSERVAÇÃO GENÉTICA<sup>1</sup>

Alexandre Magno SEBBENN<sup>2</sup>  
Carlos Eduardo Sicoli SEOANE<sup>3</sup>  
Paulo Yoshio KAGEYAMA<sup>4</sup>  
Cristina Maria Batista LACERDA<sup>4</sup>

## RESUMO

Em um prévio estudo, os efeitos do manejo florestal sobre a estrutura genética de *Tabebuia cassinoides*, foram avaliados com base em estruturas de progênies. Visando complementar esse prévio estudo, aqui são analisados esses efeitos com base na amostragem de indivíduos adultos das mesmas populações anteriormente avaliadas. Para tanto, avaliou-se por eletroforese de isoenzimas 56 árvores adultas em uma população natural e 57 em uma manejada. A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações revelou que mais de 95% da variabilidade genética encontra-se distribuída dentro das populações, e somente menos do que 5% entre populações. Entretanto, comparando-se as frequências alélicas das populações, observa-se que o manejo realizado levou à perda de alelos raros (freq. < 5%) por deriva genética. Também foram detectadas, na população manejada, reduções nas heterozigosidades e porcentagem de locos polimórficos e aumento no coeficiente de endogamia. A avaliação da estrutura das progênies evidenciou que estas foram compostas por misturas de meios-irmãos, irmãos-completos e indivíduos de autofecundação. A comparação do índice de fixação ( $f$ ) entre a geração de plântulas e as árvores adultas, mostrou indícios de seleção contra homozigotos. Com base no tamanho efetivo determinou-se que para efetivar o manejo sustentável da *Tabebuia cassinoides*, considerando o componente genético, é necessária a manutenção de pelo menos 67 árvores porta-sementes por hectare. No final do trabalho sugere-se a estratégia de conservação *in e ex situ* para minimizar os danos causados pela prática de manejo.

Palavras-chave: *Tabebuia cassinoides*; caixaeta; isoenzimas; manejo florestal; estrutura genética; conservação genética.

## ABSTRACT

A previous study evaluated the effects of forest management on the genetic structure of *Tabebuia cassinoides* using base family structure. So as to complete that previous study, it was made here sampling of adult trees within the same population. They were used 56 adults trees in a natural population and 57 in a managed population for an evaluation of isoenzymes variability. The distribution of genetic variability was more than 95% within populations and less than 5% between populations. However, when allelic frequencies were compared it was observed that this management practiced caused the loss of rare alleles (freq. < 5%) due to genetic drift. Reductions were detected in managed population for heterozygotes, for percentage of polymorphic loci and for increased inbreeding coefficient. Family structures evaluations indicated that there was mixture of half-sibs, full-sibs and selfed individuals. Comparison of the fixation index ( $f$ ) between generations of seedlings and adult trees indicated selection against homozygosity. The effective population size was determined for sustainable management of *T. cassinoides* and it is necessary to maintain at least 67 trees per hectare. It was concluded that *in situ* and *ex situ* conservation strategies must be used to minimize management damages.

Key words: *Tabebuia cassinoides*; caixaeta; isoenzymes; forestry management; genetic structure; conservation genetic.

(1) Aceito para publicação em agosto de 2001.

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

(3) Rua Projelada, 15, São Francisco, 25360-490, Niterói, RJ, Brasil.

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

## 1 INTRODUÇÃO

*Tabebuia cassinoides* (Bignoneaceae) ou caixeta é uma espécie arbórea pioneira, geralmente de pequeno porte, com 3 a 13 m de altura e 10 a 30 cm de DAP, que raramente atinge mais de 20 m de altura ou mais de 50 a 100 cm de DAP. O tronco é irregular, geralmente tortuoso e apresenta raízes aéreas na base. As flores são hermafroditas, polinizadas principalmente por abelhas e a dispersão das sementes ocorre por anemocoria e hidrocoria. A espécie distribui-se entre as latitudes 8°S (PE) a 26°S (SC), na faixa litorânea brasileira que vai dos Estados de Santa Catarina a Pernambuco. *T. cassinoides* ocorre em terrenos permanentemente alagados ou encharcados, formando em alguns locais agrupamentos densos, às vezes quase puros. Sua frequência é irregular e descontínua, uma vez que tem ocorrência localizada restrita aos locais brejosos próximos ao litoral. Ocorre na vegetação primária alterada e na vegetação secundária, na fase de capoeirão e floresta secundária. 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. Nestas formações, ocupa o extrato superior e intermediário. A espécie apresenta brotação intensa após o corte, podendo ser manejada pelo sistema de talhadia. A espécie é muito utilizada como matéria prima para artesanato e lápis, devido à leveza e maleabilidade da madeira (Carvalho, 1994). A *T. cassinoides* é explorada pelo homem há mais de 50 anos, sendo que hoje muitas de suas populações já desapareceram, ou apresentam-se abandonadas devido à baixa produtividade.

O manejo florestal sustentado é a exploração ordenada das florestas naturais e plantadas visando à produção contínua de bens madeireiros. Para se atingir estes objetivos, os programas de manejo devem ser delineados com base em dados dendrométricos de incrementos correntes anuais (ICA) e incrementos médios anuais (IMA), obtidos de inventários contínuos nos diversos tipos de sítios (solos) em que o plano de manejo é desenvolvido. Contudo, no manejo de populações naturais deve-se também considerar a constituição genotípica dos indivíduos, a qual é responsável pelas diferenças em produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos de uma espécie.

No entanto, apesar da grande importância dos fatores genéticos dos indivíduos para a exploração sustentada de uma espécie, tal componente tem sido subjugado nos planos de manejo em florestas naturais tropicais. Na realidade, não existem programas de manejo florestal que considerem o componente genético como um dos fatores primordiais para a real efetivação da sustentabilidade (Sebbenn *et al.*, 2000).

O manejo envolve alterações no tamanho populacional e nos padrões espaciais dos indivíduos dentro das populações (Bawa & Krugman, 1990; Murawski, 1995). A redução drástica no tamanho das populações, através do corte seletivo, pode levar à deriva genética, caracterizada pela perda e fixação aleatória de alelos e ao aumento do parentesco e da endogamia dentro das populações (Crow & Kimura, 1970; Mettler & Gregg, 1973; Ellstrand & Elam, 1993; Falconer & Mackay, 1997). A deriva pode inviabilizar os programas de manejo, pela redução da capacidade adaptativa, reprodutiva e produtiva das espécies. As alterações na distribuição espacial dos indivíduos dentro das populações também podem levar às mudanças na densidade e no comportamento dos polinizadores, gerando alterações nos níveis de cruzamento, como o aumento da autofecundação e conseqüentemente da endogamia (Bawa & Krugman, 1990; Murawski, 1995). Em plantas alógamas, a endogamia origina a depressão por endogamia, que é a expressão dos genes deletérios em estado de homozigose, caracterizada pela redução na produtividade, fertilidade, viabilidade das sementes, vigor e adaptação (Crow & Kimura, 1970; Allard, 1971; Mettler & Gregg, 1973; Geburek, 1986; Falconer & Mackay, 1997). Estudos sobre a depressão por endogamia em espécies florestais têm detectado reduções drásticas no crescimento das árvores (na ordem de 10 a 80% para altura), variando de acordo com a espécie, população e progênie (Fowler, 1980; Wilcox, 1983; Geburek, 1986; Wu *et al.*, 1998; Koelewijn *et al.*, 1999, entre outros).

Este estudo teve como propósito avaliar a estrutura genética de indivíduos adultos e progênies de uma população natural e uma manejada de *T. cassinoides*. Assim, se objetivou: a) estudar a distribuição da variação genética entre e dentro das populações; b) analisar os possíveis efeitos do manejo na variabilidade genética de uma população natural e uma manejada, e c) sugerir possíveis diretrizes para o manejo e para a conservação da espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

O trabalho foi realizado no município de Iguape-SP, em duas ocorrências naturais de *T. cassinoides*: uma sem influência antrópica (população natural) e outra que sofreu intervenção através de manejo tradicional (população manejada). O manejo tradicional caracteriza-se pelo corte dos indivíduos acima de 15 cm de DAP, com posterior rebrota e/ou regeneração por sementes, vindo o corte a seguir quando os indivíduos regenerados alcançarem novamente o DAP mínimo comercial (15 cm), com idade de aproximadamente 7 anos. A população natural está localizada na Estação Ecológica da Juréia, do Instituto Florestal de São Paulo, município de Iguape, SP.

Foram amostradas aleatoriamente 56 e 57 árvores adultas na população natural e manejada, respectivamente. Também foram coletadas sementes em 11 árvores na população natural e 10 na manejada. De cada árvore foram genotipadas 10 plantas totalizando 110 indivíduos na população natural e 100 na manejada. 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 (Sigma). As "corridas" foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), em geladeira com temperatura de 5°C, mantendo-se a corrente constante em 35 miliampéres 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 microlitros de solução de extração número 3 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. 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), Fosfogluose 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 (PO-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).

### 2.2 Análise Estatística

A diversidade genética dentro das populações foi analisada pela heterozigosidade observada ( $\hat{H}_o$ ), heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\hat{H}_e$ ), número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ), porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}$ ) e índices de fixação de Wright ( $\hat{f}$ ), estimativas obtidas a partir do programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989). As frequências alélicas foram estimadas por:  $\hat{p}_{ij} = n_{ij}/n_j$ , onde  $\hat{p}_{ij}$  = frequência do alelo  $i$  na população  $j$ ;  $n_{ij}$  = número de ocorrência do alelo  $i$  na população  $j$ ;  $n_j$  = número total de alelos amostrados na população  $j$ . O índice  $\hat{H}_o$  para cada loco foi obtido por  $\hat{H}_o = 1 - \sum P_{ii}$ , onde:  $P_{ii}$  = frequência do homocigoto  $ii$  e,  $\hat{H}_e$  por  $\hat{H}_e = 1 - \sum p_{ij}^2$ , onde:  $p_{ij}$  = frequência alélica estimada do  $i$ -ésimo alelo no  $j$ -ésimo loco. A estimativa média sobre os locos de  $\hat{H}_o$  e  $\hat{H}_e$  foi obtida pela média aritmética entre todos os locos analisados (monomórficos mais polimórficos). O valor  $\hat{P}$  foi calculado pela média aritmética do número total de alelos pelo número de locos, sendo que um loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassava 95%. O valor  $\hat{A}$  foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. O índice  $\hat{f}$  foi estimado para a média dos locos pela expressão (Weir, 1996):

$$\hat{f} = \frac{(\sum \hat{H}_e - \sum \hat{H}_o) + \frac{1}{2n} \sum \hat{H}_o}{\sum \hat{H}_e - \frac{1}{2n} \sum \hat{H}_o}$$

A significância de  $\hat{f}$  foi obtida a partir de 10.000 reamostragens "bootstrap" sobre locos. O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizado pelo teste exato de Haldane, fornecido também pelo programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989).

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi caracterizada por análise de variância de frequências alélicas (Weir, 1996), considerando o efeito de alelos, indivíduos e progênies como aleatórios e de populações como fixo. Assim, de acordo com Weir, a variável  $x_{ij}$  corresponde ao alelo “j” na população “i”, portanto, quando  $x_{ij}$  estava presente, recebeu o valor 1,0 e quando estava ausente recebeu o valor zero. O modelo estatístico para a análise hierárquica de indivíduos dentro de progênies foi:

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

em que,  $Y_{ijk}$  = frequência do alelo  $k$ , dentro do indivíduo  $j$ , dentro da progênie  $i$ ;  $m$  = média geral das frequências alélicas;  $f_i$  = efeito da progênie  $i$ , com  $i = 1, 2, \dots, a$ ;  $b_{j(i)}$  = efeito do indivíduo  $j$ , dentro da progênie  $i$ , com  $j = 1, 2, \dots, b_i$ ;  $g_{k(ij)}$  = efeito do alelo  $k$ , dentro do indivíduo  $j$ , dentro da progênie  $i$ , com  $k = 1, 2, \dots, n_{ij}$ . Os parâmetros genéticos estimados foram:  $\hat{\theta}_F$  = divergência genética entre progênies ou coeficiente de parentesco entre plantas dentro de progênies;  $\hat{F}$  = correlação entre alelos, dentro de indivíduos de diferentes progênies;  $\hat{f}$  = índice de fixação ou correlação entre alelos dentro de indivíduos de mesma progênie.

Para análise de variância das frequências alélicas de indivíduos, dentro de progênies, dentro de populações, utilizou-se o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = m + p_i + f_{j(i)} + b_{k(ij)} + g_{l(ijk)}$$

em que,  $Y_{ijkl}$  = frequência do alelo  $l$ , dentro do indivíduo  $k$ , dentro da progênie  $j$ , dentro da população  $i$ ;  $m$  = média geral das frequências alélicas;  $p_i$  = efeito fixo da população  $i$ , com  $i = 1, 2, \dots, a$ ;  $f_{j(i)}$  = efeito da progênie  $j$ , dentro da população  $i$ , com  $j = 1, 2, \dots, b_i$ ;  $b_{k(ij)}$  = efeito do indivíduo  $k$ , dentro da progênie  $j$ , dentro da população  $i$ , com  $k = 1, 2, \dots, c_{ij}$ ;  $g_{l(ijk)}$  = efeito do alelo  $l$ , dentro do indivíduo  $k$ , dentro da progênie  $j$ , dentro da população  $i$ , com  $l = 1, 2, \dots, n_{ijk}$ . As estimativas dos componentes da variância para a hierarquia de genes/indivíduos/progênies/populações também foram obtidas segundo Weir (1996). Os coeficientes de coancestralidade e endogamia estimados foram:  $\hat{\theta}_p$  = coeficiente de parentesco

entre indivíduos dentro de populações ou divergência genética entre populações;  $\hat{\theta}_F$  = coeficiente de parentesco ou coancestralidade das plantas dentro das progênies;  $\hat{F}$  = correlação entre alelos dentro de indivíduos de diferentes populações;  $\hat{f}$  = correlação entre alelos dentro de indivíduos dentro de populações.

A análise das frequências alélicas das árvores adultas foi realizada com base no modelo estatístico:

$$Y_{ikl} = m + p_i + b_{k(i)} + g_{l(ik)}$$

em que,  $Y_{ikl}$  = frequência do gene  $l$ , dentro do indivíduo  $k$ , dentro da população  $i$ ;  $m$  = média geral da frequência alélica;  $p_i$  = efeito fixo da população  $i$ , com  $i = 1, 2, \dots, a$ ;  $b_{k(i)}$  = efeito do indivíduo  $k$ , dentro da população  $i$ , com  $k = 1, 2, \dots, b_i$ ;  $g_{l(ik)}$  = efeito do gene  $l$ , dentro do indivíduo  $k$ , dentro da população  $i$ , com  $l = 1, 2, \dots, n_{ik}$ . Os parâmetros genéticos estimados foram:  $\hat{\theta}_p$  = divergência genética entre populações ou coeficiente de parentesco entre árvores dentro de populações;  $\hat{F}$  = índice de fixação médio para o conjunto das populações;  $\hat{f}$  = índice de fixação médio dentro de populações.

Para verificar se as estimativas médias de  $\hat{\theta}_p$ ,  $\hat{\theta}_F$ ,  $\hat{F}$ , e  $\hat{f}$  eram estatisticamente diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança a 95% de probabilidade pelo método de reamostragem *bootstrap*. Utilizaram-se 10.000 repetições sobre os locos. As análises de variâncias, descritas acima e os *bootstraps* foram obtidos através do programa GDA de Lewis & Zaykin (1999).

A correlação de cruzamento ( $\hat{r}_s$ ) ou a probabilidade de se encontrar um indivíduo de autofecundação em uma progênie onde existe outro, também de autofecundação e, a correlação de paternidade ( $\hat{r}_p$ ) ou a proporção de irmãos-completos nas progênies de cruzamento foi estimada para cada população pelo programa MLTR (“Multilocus”) de Ritland (1997)\*, baseada no modelo misto de reprodução. As pressuposições assumidas pelo modelo são dadas por Ritland & Jain (1981).

(\*) RITLAND, K. Multilocus mating system program MLTR: version 1.1. Canada: University of Toronto, 1997. (Não publicado).

O tamanho efetivo de populações ( $\hat{N}_e$ ) foi estimado para as árvores adultas por:

$$\hat{N}_e = \frac{0,5}{\hat{\theta} \left( \frac{n-1}{n} \right) + \frac{1+f}{2n}}$$

em que,  $n$  = tamanho da amostra;  $\hat{f}$  = índice de fixação da população;  $\hat{\theta}$  = coeficiente de parentesco dentro de populações. Já o tamanho efetivo para as progênies, foi estimado por Vencovsky & Crossa (1999):

$$\hat{N}_e = \frac{0,5}{\hat{\theta}_f \left( \frac{1+\hat{C}_f}{m} - \frac{1}{n} \right) + \frac{1+\hat{f}}{2n}}$$

em que,  $\hat{\theta}_f$  = coeficiente de parentesco dentro de progênies ou divergência genética entre progênies;  $m$  = número de progênies;  $n$  = número total de indivíduos avaliados na população ( $n = \sum n_i$ );  $\hat{C}_f$  é o quadrado do coeficiente de variação do número de indivíduos ( $n_i$ ) avaliados nas progênies ( $i = 1, 2, \dots, v$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Frequências Alélicas e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Os locos isocimáticos segregaram até quatro alelos (TABELA 1). A população natural apresentou quatro alelos que se encontravam ausentes na população manejada (alelo 3 no loco Mdh-1, Mdh-2 e 6Pdgh-1 e alelo 4 no loco  $\alpha$ -Est-1).

A ausência de alelos na população manejada já havia sido relatada por Sebbenn *et al.* (2000), avaliando as progênies destas populações. Os autores atribuíram o menor número de alelos na população manejada em relação à natural, aos efeitos da deriva genética, causada pelo processo de exploração. Também se verifica que dois alelos presentes nos adultos da população natural (alelo 3, loco Mdh-1 e Mdh-2) e um na manejada (alelo 3, loco  $\alpha$ -Est-2), não se encontram nas progênies das respectivas populações. Em todos estes casos, os alelos apresentavam frequência baixa (máxima 7,3%, alelo 3,  $\alpha$ -Est-2, pop. natural), sugerindo efeitos de deriva amostral, durante o processo de reprodução ou devido ao pequeno número de plantas avaliadas por progênies (10). Estas hipóteses são reforçadas pelas diferenças nas frequências alélicas entre adultos e progênies, como por exemplo, o caso do alelo 2 no loco Pgm-2, Prx-1, Idh-1 e 6Pdgh-1, alelo 3 no loco  $\alpha$ -Est-1 e alelo 1 no loco  $\alpha$ -Est-2, na população natural. Comportamento semelhante é observado na população manejada nos locos Pgi-1, Mdh-2, Prx-2,  $\alpha$ -Est-2 e 6Pdgh-1. Entretanto, de modo geral, os alelos que foram mais frequentes ou raros em um loco, em uma população, também o foram na outra, indicando baixa divergência genética entre populações.

O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg-EHW (TABELA 2) mostrou que todos os locos em ambas as populações de indivíduos adultos se encontram perfeitamente ajustados ao modelo. Já, nas progênies, observa-se desvios em cinco locos na população natural e oito na manejada, indicando que estão ocorrendo desvios de cruzamentos aleatórios nas populações. Em concordância, Sebbenn *et al.* (2000) observaram que a espécie se reproduz por sistema misto, combinando cruzamentos aleatórios, preferenciais, entre aparentados e autofecundações (TABELA 4). Desvios do EHW podem levar ao aumento dos níveis de endogamia nas populações, gerando por sua vez, depressão por endogamia, caso não existam fortes forças seletivas atuando contra estes efeitos.

TABELA 1 - Frequências alélicas em 13 locos isoenzimáticos em duas populações de indivíduos adultos e progênes de *T. cassinoides*.

População	Geração	Alelo	Pgi-2	Pgm-1	Pgm-2	Mdh-2	Mdh-3	Prx-1	Prx-2	$\alpha$ -Est-1	$\alpha$ -Est-2	Idh-1	6Pgd-1	6Pgd-2	Skdh-1
Natural	Adultos	1	0,670	0,786	0,691	0,589	0,777	0,786	0,862	0,446	0,509	0,875	0,580	1,000	0,760
		2	0,286	0,196	0,287	0,393	0,214	0,138	0,455	0,418	0,125	0,398	0,208	0,031	
		3	0,045	0,018	0,021	0,018	0,009	0,071	0,073	0,027	0,027				
		4	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	
(Juréia)	Progênes	1	0,659	0,857	0,898	0,714	0,808	0,545	0,841	0,337	0,338	0,982	0,877	1,000	0,868
		2	0,314	0,100	0,017	0,286	0,192	0,455	0,159	0,375	0,537	0,018	0,105	0,127	
		3	0,027	0,043	0,085	0,269	0,039	0,018	0,005						
		4	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109	
Manejada	Adultos	1	0,754	0,974	0,930	0,667	0,947	0,763	0,918	0,719	0,570	0,933	0,777	1,000	0,759
		2	0,158	0,009	0,053	0,333	0,053	0,237	0,082	0,211	0,404	0,077	0,233	0,223	
		3	0,088	0,018	0,018	0,070	0,026	0,018							
		4	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	
(Iguape)	Progênes	1	0,712	0,948	0,915	0,753	0,900	0,775	0,719	0,635	0,657	0,970	0,974	1,000	0,763
		2	0,242	0,036	0,032	0,247	0,100	0,225	0,281	0,290	0,343	0,030	0,026	0,215	
		3	0,045	0,016	0,053	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	
		4	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	

TABELA 2 - Probabilidades exatas de Haldane para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg em indivíduos adultos e progênies de populações de *T. cassinoides*.

Locos	Populações - Adultos		Populações - Progênies	
	Natural	Manejada	Natural	Manejada
Pgi-1	0,127	0,722	0,000	0,006
Pgm-1	0,100	1,000	0,337	1,000
Pgm-2	0,312	1,000	1,000	0,123
Mdh-2	0,269	0,237	0,000	0,000
Mdh-3	0,260	1,000	0,531	0,223
Prx-1	1,000	0,712	0,000	0,000
Prx-2	1,000	1,000	0,009	0,000
Est-1	1,000	1,000	0,063	0,017
Est-2	0,288	0,184	0,227	0,002
Idh-1	1,000	1,000	1,000	1,000
6Pgdh-1	0,062	0,115	0,661	0,050
Skdh-1	0,709	1,000	0,020	0,000

### 3.2 Distribuição da Variabilidade Genética Entre e Dentro de Populações

As análises da estrutura genética das populações mostraram, tanto para indivíduos adultos como para progênies, baixa divergência genética entre populações ( $\hat{\theta}_p < 5\%$ ), indicando que mais de 95% da variabilidade genética se encontra distribuída dentro das populações (TABELA 3). A maioria dos estudos realizados com espécies arbóreas (tanto tropicais como temperadas), utilizando marcadores genéticos co-dominantes (isoenzimas e microssatélites), têm revelado que a maior parte da variabilidade genética se encontra dentro das populações (Hamrick & Godt, 1990). A divergência genética entre populações, na maioria das situações, não supera o patamar de 5%. Maiores valores de divergência genética são encontrados quando são estudadas muitas populações, representando uma grande diversidade de *habitats* de ocorrência das espécies e/ou existem grandes diferenças na taxa de cruzamento entre populações. Desta forma, como aqui se estudou apenas duas populações, distanciadas de somente 100 km, grandes diferenças não eram esperadas. A baixa diferenciação entre a população natural e a manejada indica que o manejo, até este momento, não causou grandes mudanças nas frequências alélicas das populações, isto é, as frequências alélicas mantiveram-se parcialmente estáveis entre populações. Porém, ocorreu a perda de alguns alelos

de frequência rara ( $< 5\%$ ), os quais são de grande importância evolutiva para a espécie florestal em caso drástico de alterações ambientais, como aumento na poluição e mudanças climáticas (Krusche & Geburek, 1991). Alelos raros contribuem pouco para medidas de divergência genética entre populações ( $\hat{\theta}_p$ ). O efeito de amostragem ou deriva genética causado pelo corte seletivo, retirando indivíduos com DAP superiores a 15 cm, parece ser a causa da perda de alelos raros. Estudos em espécies florestais, avaliando a variabilidade genética em populações sob seleção para o melhoramento genético, têm revelado resultados semelhantes. Mori (1993), estudando diferentes intensidades de seleção em clones de *Eucalyptus grandis*, observou a perda de alelos de frequência inferior a 5%, quando a intensidade de seleção era de 40% e de alelos com frequência inferior a 17%, quando a intensidade de seleção utilizada era de 17%. Hamrick (1991), comparando 16 populações naturais de *Pinus taeda* com 2 pomares de sementes melhoradas, observou a perda de aproximadamente 40% dos alelos raros com a seleção. Tais resultados mostram que a redução do tamanho das populações leva à perda de alelos de baixa frequência, sendo tanto maior a perda quanto maior a redução do tamanho da população, em concordância com as predições teóricas postuladas pela literatura corrente, que avalia os efeitos do tamanho amostral sobre a deriva genética (Crow & Kimura, 1970; Mettler & Gregg, 1973; Hart & Clark, 1989; Hedrick, 1999).

TABELA 3 - Índice de fixação médio dentro de populações ( $\hat{f}$ ), conjunto das populações ( $\hat{F}$ ), divergência genética entre progênies ( $\hat{\theta}_f$ ) e divergência genética entre populações ( $\hat{\theta}_p$ ), em indivíduos adultos e progênies de duas populações de *T. cassinoides*.

	Progênies <sup>a</sup>			
	Adultos	Populações	Pop. Natural	Pop. Manejada
$\hat{f}$	0,014 [-0,064 a 0,100]	0,124 [-0,021 a 0,260]	0,050 [-0,110 a 0,219]	0,233 [0,072 a 0,413]
$\hat{F}$	0,061 [-0,034 a 0,161]	0,295 [0,175 a 0,405]	0,207 [0,052 a 0,355]	0,367 [0,224 a 0,511]
$\hat{\theta}_f$	----	0,195 [0,152 a 0,224]	0,165 [0,126 a 0,205]	0,162 [0,111 a 0,203]
$\hat{\theta}_p$	0,047 [0,015 a 0,083]	0,039 [0,152 a 0,225]	----	----

[ ] Intervalo de confiança, obtido por 10.000 reamostragens “bootstraps”.

(a) Fonte: Sebbenn *et al.* (2000).

A divergência genética entre progênies dentro de populações ( $\hat{\theta}_f$ ) foi superior a 0,125, valor esperado em progênies exclusivamente de meios-irmãos, indicando a presença de indivíduos com outros graus de parentesco. Em concordância, Sebbenn *et al.* (2000), detectaram altas taxas de autofecundação e cruzamento entre parentes (TABELA 4). Neste prévio estudo, os autores não avaliaram a correlação de autofecundação, nem a correlação de paternidade. A correlação de autofecundação ( $\hat{r}_s$ ) mostrou, para ambas as populações, valores baixos (< 0,07), revelando que não existe a tendência em uma ou outra progênie apresentar um maior número de indivíduos gerados por autofecundação e que estes se encontram

aleatoriamente distribuídos dentro das progênies. Porém, a correlação de paternidade ( $\hat{r}_p$ ) evidenciou valores relativamente altos (mínimo 0,295 - pop. manejada), sugerindo que uma boa parte das progênies geradas por cruzamento foi originada por pólen de mesma árvore, em especial na população natural. Pode-se, assim, afirmar que as progênies de *T. cassinoides* não são exclusivamente meios-irmãos, mas sim uma mistura de meios-irmãos, irmãos-completos e indivíduos de autofecundação, confirmando a magnitude da divergência genética entre progênies. Misturas de diferentes graus de parentescos dentro de progênies de polinização aberta em espécies florestais também foram encontradas por Millar *et al.* (2000), Seoane *et al.* (2001) e Sebbenn *et al.* (2000).



TABELA 4 - Tamanho da amostra ( $n$ ), clones repetidos ( $n_{clones}$ ), número de indivíduos diferentes ( $n'$ ), número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}$ ), heteroziguidade observada ( $\hat{H}_o$ ), heteroziguidade esperada ( $\hat{H}_e$ ), índice de fixação ( $\hat{f}$ ), tamanho efetivo populacional ( $\hat{N}_e$ ), relação entre tamanho efetivo e tamanho da amostra ( $\hat{N}_e/n$ ), taxa de cruzamento multilocos ( $\hat{t}_m$ ), unilocos ( $\hat{t}_s$ ), entre aparentados ( $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ ), taxa de autofecundação ( $\hat{s}$ ), correlação da taxa de cruzamento ( $\hat{r}_s$ ) e correlação de paternidade ( $\hat{r}_p$ ), em populações de indivíduos adultos e progênes de *T. cassinoides*.

	Adultos		Progênes <sup>a</sup>	
	Natural	Manejada	Natural	Manejada
$n$	56	57	110	100
$n_{clones}$	10	2	----	----
$n'$	46	55	----	----
$\hat{A}$	2,7 (0,2)	2,4 (0,2)	2,5 (0,2)	2,3 (0,2)
$\hat{P}$ (95%)	92,3%	84,6%	84,6%	76,9%
$\hat{H}_o$	0,376 (0,050)	0,382 (0,045)	0,253 (0,041)	0,174 (0,036)
$\hat{H}_e$	0,264 (0,048)	0,267 (0,048)	0,314 (0,051)	0,266 (0,049)
$\hat{f}$	0,017 [-0,083 a 0,123]	0,012 [-0,070 a 0,091]	0,207 [0,051 a 0,355]	0,357 [0,224 a 0,511]
$\hat{N}_e$	8,7	9,0	31,4	29,0
$\hat{N}_e/n$	0,19	0,16	0,29	0,29
$\hat{t}_m$	----	----	0,895 (0,048)	0,783 (0,104)
$\hat{t}_s$	----	----	0,720 (0,062)	0,690 (0,090)
$\hat{t}_m - \hat{t}_s$	----	----	0,175 (0,040)	0,092 (0,048)
$\hat{s}$	----	----	0,105	0,217
$\hat{r}_s$	----	----	0,054 (0,010)	0,068 (0,016)
$\hat{r}_p$	----	----	0,547 (0,095)	0,295 (0,070)

( ) Erro padrão da média.

[ ] Intervalo de confiança, obtido por 10.000 reamostragens "bootstraps".

(a) Fonte: Sebbenn *et al.* (2000).

Nas progênies, o índice de fixação dentro de populações ( $\hat{f}$ ) e o conjunto das populações ( $\hat{F}$ ) apresentaram valores positivos altos e significativamente diferentes de zero (TABELA 3), com exceção do  $\hat{f}$ , na população natural, indicando excesso de homozigotos e que a endogamia é comum tanto nas progênies da população natural como na manejada, mas especialmente na última. No entanto, avaliando-se estes mesmos índices nos adultos, observa-se valores positivos e não significativamente diferentes de zero, demonstrando ausência de endogamia e sugerindo seleção para heterozigotos entre a fase de plântulas e adultos. Seleção para heterozigotos entre a fase de plântulas e a fase adulta também foi detectada em *Pinus ponderosa* (Linhart *et al.*, 1981), *Pseudotsuga menziensis* (Shaw & Allard, 1982), *Abies balsamae* (Neale & Adams, 1985), *Picea mariana* (Boyle & Moergestern, 1986), *Pinus radiata* (Plessas & Strauss, 1986), *Eucalyptus rhodantha* (Sampson *et al.*, 1989), *Euterpes edulis* (Reis, 1996), *Eucalyptus argutifolia* (Kennington & James, 1997), *Genipa americana* (Sebbenn *et al.*, 1998), *Eucalyptus marginata* (Millar *et al.*, 2000), *Metrosideros excelsa* (Schmidt-Adams *et al.*, 2000) e *Cariniana legalis* (Sebbenn *et al.*, 2000), entre outros. Este fenômeno é altamente favorável à manutenção da variabilidade genética em populações naturais. Contudo, se o efeito gargalo causado pelo manejo seletivo for muito intenso, o parentesco dentro das populações pode crescer muito rapidamente (poucas gerações) levando à erosão genética das populações.

Observa-se ainda, que o índice  $\hat{F}$  foi muito superior ao índice  $\hat{f}$ , indicando que o processo de deriva combinado com o sistema reprodutivo foram os responsáveis pelos altos níveis de endogamia, em especial nas progênies.

### 3.3 Variabilidade Genética Dentro de Populações

Uma avaliação visual dos genótipos isoenzimáticos revelou a presença de indivíduos idênticos nas populações de árvores adultas. Na população natural foram detectados seis indivíduos repetidos, sendo dois com uma cópia e quatro com duas cópias, totalizando 10 possíveis clones. Na manejada foram detectados apenas dois indivíduos repetidos,

sendo ambos com apenas uma cópia. O menor número de clones na população manejada, possivelmente está associado ao processo de exploração, isto é, o corte seletivo teria eliminado os clones na população natural.

O número de alelos por locos ( $\hat{A}$ ) e a porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}$ ) foram maiores nas árvores adultas do que nas progênies e na população natural em relação à manejada (TABELA 4). Primeiro, isto mostra que ocorreu deriva genética durante o processo de reprodução e, segundo, que o manejo reduziu os níveis de variabilidade genética entre e dentro de locos. As heterozigosidades observadas ( $\hat{H}_o$ ) e esperadas ( $\hat{H}_e$ ) e o índice de fixação dentro das populações ( $\hat{f}$ ) também foram muito superiores nas plantas adultas em relação às progênies, sugerindo a presença de deriva genética devido ao sistema de reprodução, manejo e seleção contra homozigotos nas populações.

De forma interessante, as heterozigosidades e o índice de fixação foram semelhantes nos adultos da população natural e manejada, mas as heterozigosidades caíram e o índice de fixação aumentou drasticamente na geração de progênies. Na população natural, a heterozigosidade observada caiu e a esperada e o índice de fixação subiram nas progênies, demonstrando que esta população, apesar de perder variabilidade genética ( $\hat{H}_o$ ) e aumentar a endogamia ( $\hat{f}$ ) não perdeu potencial evolutivo ( $\hat{H}_e$ ) com o processo de reprodução. Já a população manejada perdeu maior variabilidade genética e aumentou os níveis de endogamia.

Os níveis de heterozigosidade observados nas populações de *T. cassinoides* podem ser considerados altos se comparados com outras espécies arbóreas tropicais. Hamrick & Godt (1990) estimaram em 0,157 a  $\hat{H}_e$  de espécies de polinização entomofílica e dispersão de sementes via anemocória. Murawski & Hamrick (1991) estimaram, para espécies arbóreas tropicais comuns, uma  $\hat{H}_e$  média de 0,146. Tais resultados, comparados com os aqui obtidos, demonstram que *T. cassinoides* apresenta altos níveis de variabilidade genética.

A alta variabilidade pode ser atribuída ao fato de a espécie ser comum, apresentar alta densidade espacial, sofrer seleção contra homozigotos e apresentar eficientes mecanismos de dispersão de genes (pólen e sementes), permitindo assim, uma intensa troca gênica entre e dentro de populações.

De modo geral, estes resultados indicam que certos níveis de endogamia são naturalmente gerados nas progênes de *T. cassinoides*, pelo processo de reprodução, porém, o corte seletivo realizado pelo manejo está alterando drasticamente o sistema de reprodução da espécie, gerando maiores níveis de endogamia nas populações sob manejo. Este comportamento já havia sido descrito como plausível por Sebbenn *et al.* (2000), apesar de os autores não terem avaliado a geração de indivíduos adultos

### 3.4 Manejo Florestal e Conservação Genética

A variabilidade genética foi menor na população manejada (TABELA 4) devido à perda de alelos raros e aumento na taxa de autofecundação e endogamia nas progênes. O corte seletivo leva à exclusão de genótipos e, conseqüentemente, à perda de alelos por deriva genética, como já discutido anteriormente. Como a espécie se regenera por rebrota, após o corte, os genótipos não são efetivamente eliminados das populações, mas excluídos dos eventos reprodutivos, entre a fase de corte e a fase em que a regeneração entra novamente em reprodução. A redução da população reprodutiva, pelo manejo, causa um efeito conhecido como gargalo genético, que é o afinilamento da base genética da população, tendo como conseqüências a deriva genética, caracterizada pela perda de alelos de baixa freqüência e o aumento do grau de parentesco e dos níveis de endogamia dentro das populações (Ellstrand & Elam, 1993). Desta forma, as freqüências alélicas das próximas gerações sempre serão dominadas pelas freqüências alélicas das porta-sementes, devido a estas produzirem maior quantidade de pólen e óvulos. Para tanto, é necessária a manutenção de um número de porta-sementes por hectare que minimize os efeitos adversos da deriva genética.

A eliminação total das porta-sementes e a redução do DAP mínimo de corte para 12 cm, que é a proposta atual dos manejadores, poderá, com o passar das gerações, levar à degradação genética e à redução na produtividade das populações sob manejo. A determinação do número mínimo de porta-sementes a serem mantidos por hectare pelo manejo deve ser feita com base no  $\hat{N}_e$ . A estimativa do tamanho efetivo populacional ( $\hat{N}_e$ ) foi obtida para os adultos considerando o provável parentesco ( $\hat{\theta}_p$ ) e a endogamia presente dentro das populações ( $\hat{f}$ ). O coeficiente  $\hat{\theta}_p$ , mede a divergência genética entre populações a partir do parentesco dentro das populações. Já, o  $\hat{N}_e$  para progênes foi medido pelo coeficiente de parentesco ou coancestralidade entre plantas dentro de progênes ( $\hat{\theta}_f$ ) e pela endogamia no conjunto das progênes ( $\hat{f}$ ) (TABELA 4).

O tamanho efetivo foi semelhante entre a população natural e a manejada, tanto para as progênes como para as plantas adultas. Contudo, a relação entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral, excluindo-se os clones idênticos ( $n'$ ) foi maior na população natural de indivíduos adultos (0,19) do que na manejada (0,16), indicando que cada 100 árvores adultas na população natural e manejada correspondem, respectivamente, a 19 e 16 árvores de uma população infinita sem parentesco, endogamia e praticando cruzamentos aleatórios (pop. panmítica ideal). Para progênes, tal relação foi idêntica (0,29), apesar do menor tamanho amostral na população manejada. O  $\hat{N}_e$  das plantas adultas foi expressivamente inferior aos apresentados pelas progênes, para ambas as populações. O  $\hat{N}_e$  é mais afetado pelo parentesco dentro das populações do que pela endogamia. Portanto, a presença de parentesco dentro das populações causa maior redução no  $\hat{N}_e$ , do que a endogamia por si só.

O tamanho efetivo de 50 plantas tem sido preconizado como mínimo para a conservação genética de uma população a curto prazo (Frankel & Soulé, 1981). Como este tamanho foi determinado para espécies que apresentam gerações discretas, sem sobreposição de gerações, Sebbenn *et al.* (2001)\* sugeriram que este número seja ampliado em espécies florestais para pelo menos 60. Adotando-se tal recomendação, os resultados mostraram que para se manter o tamanho efetivo de 60 plantas por população, é necessário preservar pelo menos 318  $[(46 \times 60)/8,7]$  árvores por população. Definindo arbitrariamente a área ocupada por uma população de *T. cassinoides* em, no máximo 4 hectares, a conservação *in situ* de 80 (318 árvores/4 ha) árvores por hectare, permite a preservação do tamanho efetivo de 60. Sebbenn *et al.* (2000) determinaram com base em estimativas otimistas, a necessidade de preservar 60 árvores porta-sementes por hectare para a conservação de um tamanho efetivo de 50 plantas por hectare, resultado muito semelhante ao encontrado diretamente com avaliação do tamanho efetivo das populações de indivíduos adultos. Tendo em vista que ocorrem aproximadamente 324 indivíduos por hectare com DAP superior a 15 cm\*\*, 80 árvores por hectare, correspondem à conservação de apenas 25% do total dos indivíduos, logo, a exploração de 75% das árvores com DAP superior a 15 cm. As plantas preservadas como porta-sementes devem estar em plena fase reprodutiva e distribuídas uniformemente por toda a área dos caixetais, a fim de otimizar os cruzamentos e reduzir a probabilidade de selecionar clones idênticos e indivíduos aparentados.

O aumento no número de porta-sementes possivelmente reduz a taxa de autofecundação, pela menor distância entre as plantas e, principalmente, aumentando o número de indivíduos contribuintes para as frequências alélicas das próximas gerações, reduzindo assim as chances de perda de alelos por deriva genética. Recomenda-se também que populações sejam conservadas intactas *in situ*, em toda área de ocorrência natural da espécie e *ex situ* com material igualmente coletado de toda a área de ocorrência. Para a conservação *ex situ* recomenda-se, com base em Sebbenn *et al.* (2001), que pelo menos 30 populações sejam amostradas, sendo em cada uma coletada sementes de pelo menos 15 árvores.

Os resultados obtidos neste estudo, apesar de esperados pela teoria corrente em genética de populações, são preliminares, sendo importante a avaliação genética de um número maior de populações manejadas e naturais, a fim de sedimentar melhor os resultados observados. Assim, sugere-se em um futuro estudo, a análise de mais uma população natural e três manejadas. O tamanho amostral para plantas adultas pode ser o mesmo aqui utilizado (> 50 árvores/população), mas o de progênies deve ser ampliado para aproximadamente 30 progênies por população e 10 plantas por progênie, com base em Sebbenn *et al.* (2001).

## 5 CONCLUSÕES

1. A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações revelou que mais de 95% da variabilidade genética se encontra distribuída dentro das populações.
2. A divergência genética entre a população manejada e a natural, apesar de baixa, revelou a perda de alelos raros, por deriva genética, causada pelo manejo realizado.
3. O manejo realizado causou a perda de alelos raros, redução nas heterozigosidades, porcentagem de locos polimórficos e aumento no coeficiente de endogamia.
4. As progênies foram compostas por misturas de meios-irmãos, irmãos-completos e indivíduos de autofecundação.
5. Para efetivar o manejo sustentável da espécie, considerando o componente genético, é necessária a conservação de pelo menos 80 árvores porta-sementes por hectare.

## 6 AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos aos técnicos Elza M. Ferraz e Gelson D. Fernandes pelo apoio técnico no laboratório de eletroforese de isoenzimas do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP e à FAPESP pelo financiamento do projeto (processo nº 95/04638-0).

(\*) SEBBENN, A. M.; VENCOSKY, R.; KAGEYAMA, P. Y. Tamanho e número de populações para a conservação genética de espécies florestais. São Paulo: Instituto Florestal, 2001. 37 p. (Em preparação).

(\*\*) Marquesini, dados não publicados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, S. A. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574 p.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.
- BAWA, K. S.; KRUGMAN, S. L. Reproductive biology and genetics of tropical trees in relation to conservation and management. In: GOMES-POMPA, A.; WHITMORE, T. C.; HADLEY, M. **Rain Forest regeneration and management.** Roma: UNESCO, 1990. v. 6, p. 119-136.
- BOYLE, T. J. B.; MORGENSTERN, E. K. Estimation of outcrossing rates in six populations of Black Spruce in central New Brunswick. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 35, n. 2, p. 102-106, 1986.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira.** Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.
- CROW, J. F.; KIMURA, M. A. **An introduction to population genetics theory.** London: Harper & Row Publishers, 1970. 591 p.
- ELLSTRAND, N.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review Ecology and Systematic**, Davis, v. 24, p. 217-241, 1993.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. **Introduction to quantitative genetics.** Harlow: Longman Group Ltd., 1996. 464 p.
- FOWLER, D. P. Hybridization of Black Spruce and Serbian Spruce. **MFRC Information**, California, v. 112, p. 1-30, 1980.
- FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. S. **Conservation and evolution.** Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327 p.
- GEBUREK, T. Some results of inbreeding depression in serbian spruce (*Pecea omorica* (Panc.) Purk.). **Silvae Genetica** Frankfurt, v. 35, n. 4, p. 169-172, 1986.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D. *et al.* (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources.** Sunderland: Sinauer Associated Inc., 1990. p. 43-63.
- HAMRICK, J. L. Allozyme diversity of natural stands versus seed orchard Loblolly Pine. In: TWENTY-THIRD MEETING AND ACTIVITY REPORTS OF THE CANADIAN TREE IMPROVEMENT ASSOCIATION, 1991, Ottawa. **Proceedings...** 21 p.
- HART, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of populations genetics.** Sunderland: Sinauer Associated Inc., 1989. 682 p.
- HEDRICK, P. W. **Genetics of populations.** Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1999. 552 p.
- KENNINGTON, W. J.; JAMES, S. H. The effect of small population size on the mating system of a rare mallee, *Eucalyptus argutifolia* (Myrtaceae). **Heredity**, Lund, v. 78, p. 252-260, 1997.
- KOELEWIJN, H. P.; KOSKI, V.; SAVOLAINEN, O. Magnitude and timing of inbreeding depression in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Evolution**, San Francisco, v. 53, n. 3, p. 758-768, 1999.
- KRUSCHE, D.; GEBUREK, T. Conservation of forest gene resources as related to sample size. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 40, p. 145-150, 1991.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **GDA - Genetic Data Analysis: version 1.0(d12) for Windows.** Albuquerque: The University of New Mexico, 1999. 89 p.
- LINHART, Y. B. *et al.* Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. **Heredity**, Lund, v. 46, p. 407-426, 1981.
- METTLER, L. E.; GREGG, T. G. **Genética de populações e evolução.** São Paulo: Polígono e EDUSP, 1973. 262 p.
- MILLAR, M. A. *et al.* Mating system studies in jarrah, *Eucalyptus marginata* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 48, p. 475-479, 2000.

- MORI, E. S. Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção. 1993. 118 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity*, Lund, v. 67, p. 167-174, 1991.
- MURAWSKI, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In: LOWMAN, M. D.; NADKARNI, N. M. (Ed.). *Forest canopies*. New York: Academic Press, 1995. p. 457-493.
- \_\_\_\_\_; DAYANANDAN, B.; BAWA, K. S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forest. *Biotropica*, St. Louis, v. 26, n. 1, p. 23-29, 1994.
- NEALE, D. B.; ADAMS, W. T. The mating system in natural and shelterwood stands of Douglas-fir. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 71, p. 201-207, 1985.
- PLESSAS, M. E.; STRAUSS, S. H. Allozyme differentiation among populations, stands, and cohorts in Monterey pine. *Canadian Journal Forest Research*, Edmonton, v. 16, p. 1155-1164, 1986.
- REIS, M. S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitreiro (*Euterpe edulis* M.). 1996. 210 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. *Heredity*, Lund, v. 47, p. 35-52, 1981.
- SAMPSON, J. F.; HOPPER, S. D.; JAMES, S. H. The mating system and population genetic structure in a bird-pollinated mallee, *Eucalyptus rhodantha*. *Heredity*, Lund, v. 63, p. 383-393, 1989.
- SCHIMIDT-ADAMS, G.; YOUNG, A. G.; MURRAY, B. G. Low outcrossing rates and shift in pollinators in New Zealand Pohutukawa (*Matrosideros excelsa*; Myrtaceae). *American Journal of Botany*, Oklahoma, v. 87, n. 9, p. 1265-1267, 2000.
- SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSVKY, 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.
- SEBBENN, A. M. *et al.* Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, v. 58, p. 25-40, 2000.
- SEBBENN, A. M. *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.
- SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. *Rev. Inst. Flor.*, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 19-26, 2001.
- SHAW, D. V.; ALLARD, R. W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-Fir using isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 62, p. 113-120, 1982.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. *Isozymes in plant biology*. Portland: Dioscorides Press, 1989. p. 46-67.
- SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. BIOSYS-1: a FORTRAN computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. *Journal of Heredity*, Cary, v. 72, p. 282-283, 1989.
- VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Variance effective population size under mixed self and random mating with applications to genetic conservation of species. *Crop Science*, Madison, v. 39, p. 1282-1294, 1999.

SEBBENN, A. M. *et al.* Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data.** Sunderland: North Carolina State University, Sinauer Associated Inc. Pub., 1996. 445 p.

WILKOX, M. D. Inbreeding depression and genetic variances estimated from self- and cross-pollinated families of *Pinus radiata*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 32, p. 89-96, 1983.

WU, H. X.; MATHESON, A. C.; SPANCER, 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.