

# 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. Indícios 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 nº 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 *k*  $\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)$ . 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.

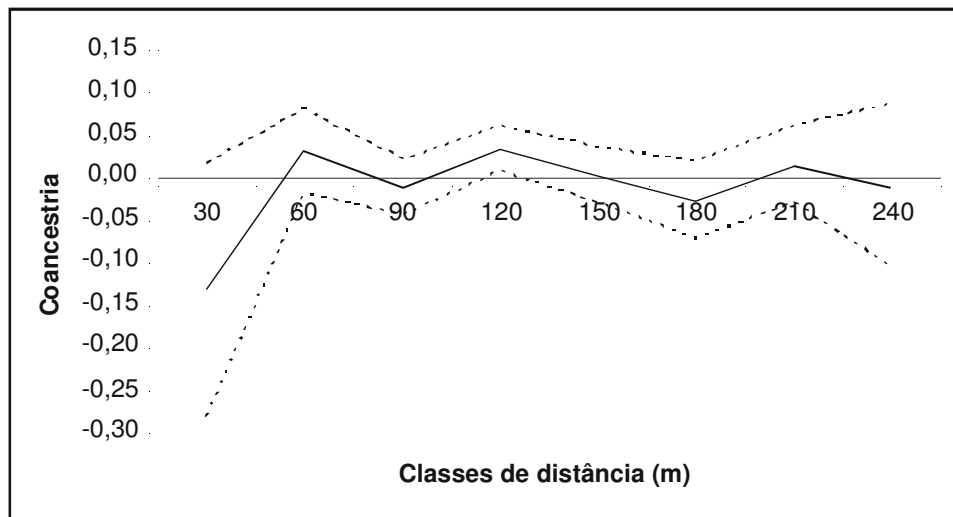


FIGURA 1 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população JUN1. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

CAVALLARI NETO, M. *et al.* Estrutura genética espacial em populações de *Tabebuia cassinoides* por locos isoenzimáticos.

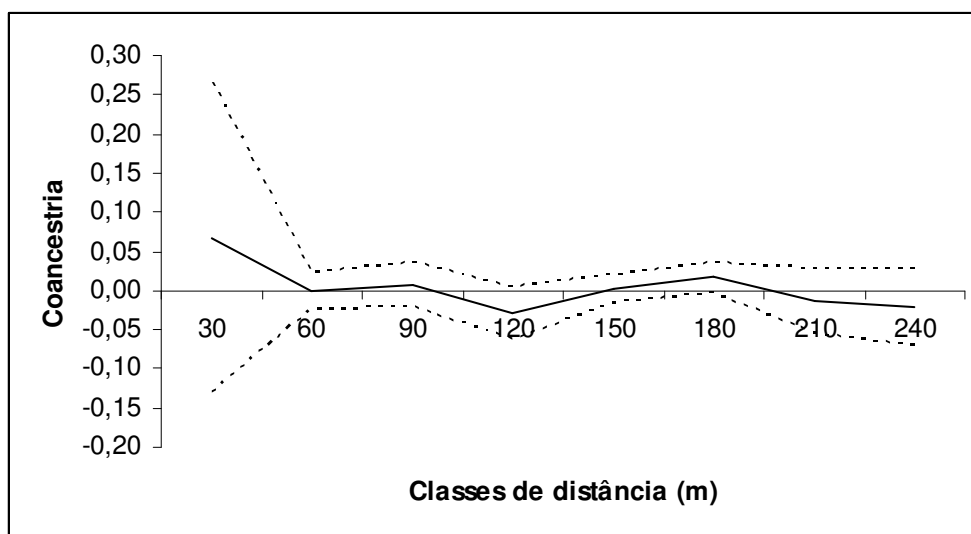


FIGURA 2 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população JUN2. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

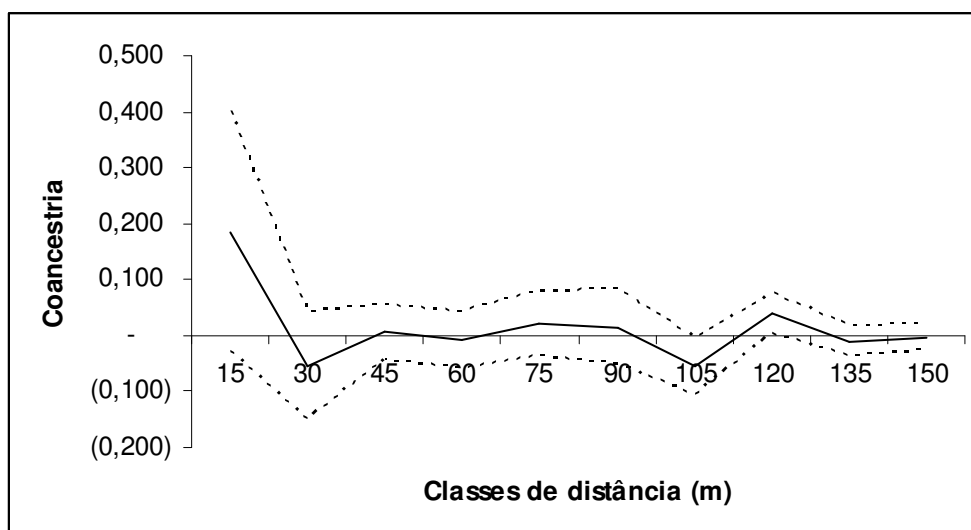


FIGURA 3 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população JUN3. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

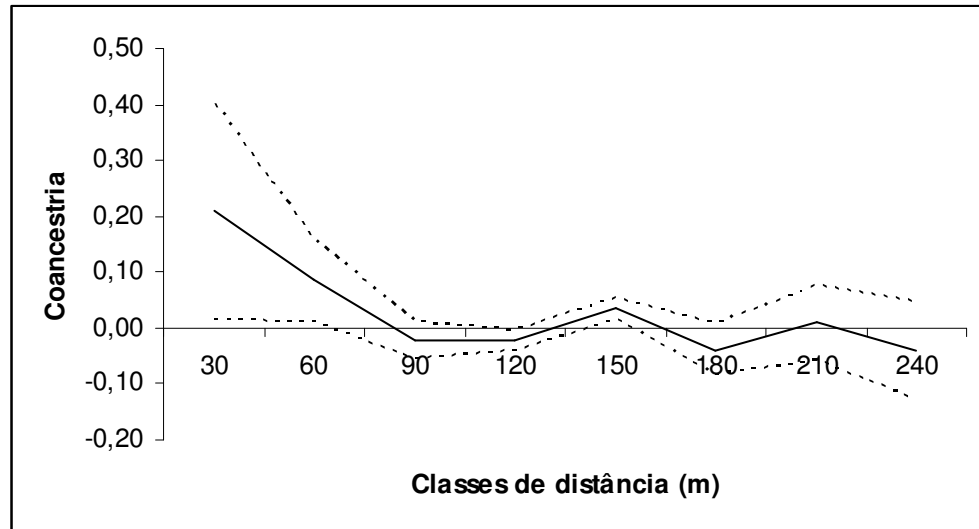


FIGURA 4 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população CIN. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).

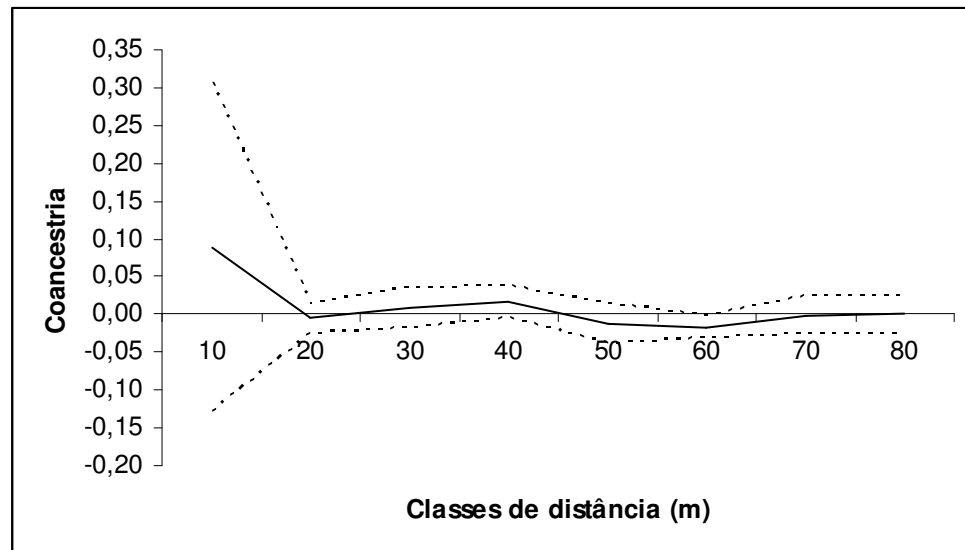


FIGURA 5 – Correlograma do coeficiente médio de coancestria entre pares de indivíduos para sete classes de distância na população RET. (A linha contínua representa a estimativa da coancestria e a linha tracejada representa os limites do intervalo de confiança a 95% de probabilidade).



#### 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](http://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. **Heredity**, 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.