

ESTRUTURA GENÉTICA DE PEROBA (*Aspidosperma polyneuron*) NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL¹

GENETIC STRUCTURE OF (*Aspidosperma polyneuron*) IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

Léo ZIMBACK^{2,3,5}; Edson Seizo MORI³;
Paulo Yoshio KAGEYAMA⁴; Hideyo AOKI²

RESUMO – A estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell Arg. (Apocynaceae) foi estudada utilizando a análise de marcadores microssatélites, nas localidades de Bauru, Gália, Avaré, Piracicaba, Valinhos, Teodoro Sampaio, Botucatu, Porto Ferreira, municípios do Estado de São Paulo, e Selvíria (Mato Grosso do Sul) onde foram coletadas folhas para extração de DNA da população de cada local. Foram obtidos sete locos polimórficos e quatro monomórficos. Analisando os locos polimórficos, observou-se que o número de alelos variou de dois a seis, que demonstraram uma alta heterozigosidade ($h_o = 0,5209$). Em oito populações estudadas, os coeficientes de fixação f foram negativos com média de $-0,0173$ das nove populações e a fixação total F foi $0,1034$, enquanto o valor de coancestralidade θ_p entre populações foi $0,1187$. Foram também obtidos valores de fixação dentro de populações F_{IS} ($-0,0669$), fixação total F_{IT} ($0,0747$) e fixação genética entre populações com F_{ST} ($0,1343$) e Gst (Hedrick) ($0,4875$). O fluxo gênico médio obtido Nm foi $1,6121$. Exibe estrutura genética típica de espécie alógama, com baixo coeficiente de endogamia e alta heterozigosidade, com isolamento entre populações. A população Piracicaba indicou a maior erosão genética e isolamento; as outras populações ainda mostram a variabilidade original para coletas visando à conservação e melhoramento genético.

Palavras-chave: genética de populações; microssatélites; marcadores moleculares; conservação genética.

ABSTRACT – The genetic structure of *Aspidosperma polyneuron* Muell Arg. (Apocynaceae) was studied with SSR marker analysis, in Bauru, Gália, Avaré, Piracicaba, Valinhos, Teodoro Sampaio, Botucatu, Porto Ferreira (São Paulo state cities), and Selvíria city (Mato Grosso do Sul state), where leaves were collected for extracting DNA from the population of each site. Seven polymorphic and four monomorphic loci were obtained. Analyzing polymorphic loci, allele number ranged from two to six alleles, and showed high heterozygosity ($h_o = 0.5209$). In eight populations the endogamy inbreeding coefficient f was negative, the nine populations average was -0.0173 , and total inbreeding coefficient F was 0.1034 , meanwhile the coancestry value θ_p among populations was 0.1187 . Values of fixation within population F_{IS} (-0.0669), total inbreeding F_{IT} (0.0747), genetic fixation among populations with F_{ST} (0.1343) and Gst (Hedrick) (0.4875) index were also obtained. The average gene flow Nm was 1.6121 . It displays genetic structure typical of allogamous species with low inbreeding coefficient and high heterozygosity, with isolation between populations. Piracicaba population showed the greatest genetic erosion and isolation, the other populations still remain the original variability for collections aiming conservation and breeding.

Keywords: population genetics; SSR; molecular makers; genetic conservation.

¹Recebido para análise em 14.09.11. Aceito em 27.12.11. Publicado *online* em 29.12.11.

²Instituto Florestal, Rua do Horto, 931, 02377-000 São Paulo, SP, Brasil.

³Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Caixa Postal 237, 18603-970 Botucatu, SP, Brasil. esmori@fca.unesp.br

⁴Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, Caixa Postal 9, 13480-900 Piracicaba, SP, Brasil. kageyama@carpa.ciagri.usp.br

⁵Autor para correspondência: Léo Zimback – lzimback@terra.com.br

1 INTRODUÇÃO

A peroba (*Aspidosperma polyneuron* Muell Arg.) é uma espécie secundária tardia que ocorre no Brasil e é utilizada como madeira para construção civil (Correa, 1974). As espécies secundárias tardias são muito sensíveis à perturbação antrópica (Kageyama et al., 1990), já que este grupo ecológico surge sob o sombreamento do dossel e sofre mais o perigo de extinção, tanto que, no Estado de São Paulo é encontrada, praticamente, apenas em unidades de conservação. Como as áreas onde ela ocorria já foram muito desmatadas, torna-se prioritário nesse Estado levantar a estrutura genética da espécie para restaurar a diversidade a partir dos fragmentos onde ela ainda existe.

A mutação, migração, seleção e deriva, que operam dentro dos contextos de cada espécie e população (Hamrick, 1982), vão definir a estrutura genética da população não aleatória, podendo também indicar o grau de alteração e/ou vulnerabilidade. Diferentes metodologias vêm sendo utilizadas para caracterizar a estrutura genética de populações. Uma das primeiras preocupações é a verificação da aderência dos dados às proporções de Hardy-Weimberg, que em última análise verifica a presença de associações entre os alelos dentro dos indivíduos (Weir, 1996). Wright (1951) estabeleceu um segundo caso de equilíbrio nas proporções genotípicas e gênicas, no qual as populações podem apresentar um nível de endogamia estável, inerente ao sistema reprodutivo da espécie. Assim, Wright define o coeficiente F como uma medida do desvio do equilíbrio de panmixia nas populações, um indicador do modo de reprodução da espécie que é importante também no melhoramento genético para cálculos do coeficiente de herdabilidade. As estatísticas de F de Wright (1951) ou de Cockerham (Weir e Cockerham, 1984) são utilizadas para modelos aleatórios, enquanto a abordagem de Nei (1978) pode ser utilizada sem a necessidade de pressupostos sobre a natureza das amostragens.

Os microssatélites atualmente são os marcadores codominantes mais utilizados nesses

estudos (Butcher et al., 1999; Byrne et al., 1996; Smith e Devey, 1994), como marcadores genéticos mais neutros do que isoenzimas e com grande número de alelos, o que dá grande poder de análise da diferenciação entre populações e perda de diversidade dentro de populações. Neste trabalho os marcadores microssatélites foram utilizados para estudar a estrutura genética em populações naturais da peroba, com o objetivo de utilizar a estatística F para avaliar taxa aparente de cruzamentos, isolamento das populações e deriva genética, assim como a distância genética entre populações para nortear o método de escolha das populações e indivíduos para a conservação *in situ* e *ex situ*, que deve ser utilizada para repovoar o Estado de São Paulo, podendo também ser utilizada para o melhoramento genético por ser uma espécie madeireira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Populações

Foram coletadas amostras de folhas de 40 árvores em cada um dos nove locais estudados, sendo oito no Estado de São Paulo e um em Mato Grosso do Sul, neste caso próximo à divisa com o Estado de São Paulo, conforme mostra a Tabela 1. O Parque Estadual do Morro do Diabo é a área maior e a mais preservada em população de peroba do Estado de São Paulo. A segunda área em tamanho é a da Estação Ecológica de Caetetus, que já era uma área de reserva com topografia acidentada de uma antiga fazenda de café, que permitiu alguma proteção. As demais áreas são menores e com grande efeito antrópico por eliminação de indivíduos da população, sendo a ocorrência mais esparsa nestas áreas. A única exceção é a Fazenda Edgardia da UNESP de Botucatu, que era um fragmento protegido entre uma área alagada e a íngreme Cuesta basáltica (Serra de Botucatu). Esse isolamento na Fazenda Edgardia não permitiu acesso para o desmatamento na época em que se plantava café.

Tabela 1. Locais de coleta de populações de *Aspidosperma polyneuron*, tamanho dos fragmentos e localização geográfica.
Table 1. Populations collection sites of *Aspidosperma polyneuron*, size of the fragments and their respective geographic coordinates.

Local (Município)	Área (ha)	Coordenadas geográficas
1. Parque Estadual Morro do Diabo (Teodoro Sampaio-SP)	33.845	22°30'S e 52°16'W
2. Fazenda Edgardia da UNESP (Botucatu-SP)	980	22°52'S e 48°26'W
3. Estação Ecológica de Ibicatu (Piracicaba-SP)	76	22°47'S e 47°49'W
4. Estação Ecológica de Bauru (Bauru-SP)	288	22°14'S e 49°05'W
5. Estação Ecológica de Valinhos (Campinas-SP)	17	22°58'S e 47°01'W
6. Parque Estadual de Porto Ferreira (Porto Ferreira-SP)	612	21°50'S e 47°26'W
7. Floresta Estadual de Avaré (Avaré-SP)	110	23°04'S e 48°55'W
8. Estação Ecológica de Caetetus (Gália-SP)	2.179	22°25'S e 49°41'W
9. UNESP Ilha Solteira (Selvíria-MS)	75	20°22'S e 51°22'W

2.2 Extração de DNA e Eletroforese

O DNA foi extraído de 60 miligramas de peso fresco de folhas conforme metodologia de Ferreira e Gratapaglia (1998), utilizando também centrifugação (13.200 rpm por 5 minutos) para precipitar impurezas químicas do DNA diluído em TE 0.1 x, tomando o sobrenadante como amostra purificada. Após a extração, a amostra foi quantificada para proceder a diluição a 4 ng/ μ L. Nessa concentração, 1 μ L da solução foi utilizado para a reação de PCR adicionando 10 μ L contendo 1 μ L tampão de reação 10 x; 0,8 μ L de MgCl₂ a 25 mM; 2,5 μ L de DNTP a 2,5 mM cada nucleotídeo; 0,1 μ L de Taq polimerase a 5u/ μ L; 0,6 μ L de mix do par de *primers* microssatélites a 10 pmol/ μ L e água deionizada esterilizada para completar o volume.

Cada reação foi protegida da evaporação com 15 μ L de óleo mineral. As amostras foram submetidas a 92 °C por 2 minutos para a desnaturação, 45 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto na temperatura de anelamento de cada par de *primers* (50 a 60 °C) e 1 minuto a 72 °C, a seguir incubadas por 6 minutos a 72 °C. Fragmentos gerados por amplificação foram separados de acordo com o tamanho de corrida em gel desnaturante de poliacrilamida 6 % com uréia a 6 Mol/L, mergulhado em tampão 1x TBE

[89 mM Tris (pH 8.3), 89 mM de ácido bórico e 5 mM EDTA] para passar a corrente.

Foram testados *primers* de espécies arbóreas citadas na literatura de diversas famílias botânicas, com a finalidade de tentar transferir para esta espécie algum locus que estivesse conservado na família Apocynaceae, que não possui *primers* desenvolvidos na literatura.

2.3 Análise dos Dados

A caracterização da variação genética das populações foi feita por meio de estimativas das frequências alélicas e da obtenção dos índices de diversidade usuais. As frequências alélicas foram estimadas com o emprego do programa PopGene (Yeh e Yang, 1997), utilizando a seguinte expressão:

$$p_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_{.j}}$$

sendo que:

p_{ij} : estimativa da frequência do alelo i na população j;
 n_{ij} : número de ocorrências do alelo i na amostra da população j, e
 $n_{.j}$: número total de alelos encontrados na amostra da população.

Com esses valores, o número efetivo de alelos, cujo valor fornece uma tendência de distribuição de frequências, foi calculado da seguinte forma:

$$n_e = \frac{1}{\sum p_{ij}^2}$$

A heterozigosidade observada (H_o) foi obtida pela média do número de genótipos heterozigotos em relação ao total de genótipos em cada loco e para as médias dos locos. A heterozigosidade esperada, ou mais apropriadamente, a diversidade gênica (H_e), foi estimada pela média das h_e nos locos, obtida de acordo com a seguinte expressão segundo Nei (1978):

$$h_e = \frac{2n(1 - \sum p_i^2)}{(2n - 1)}$$

em que n : número de indivíduos, e p_i : frequência do i ésimo alelo.

Os índices de fixação f foram obtidos por:

$$f = \frac{(H_e - H_o)}{H_e}$$

Foram também realizados testes para a diferenciação de populações em termos de frequências alélicas, para verificar a existência de diferenças significativas entre elas. As análises foram realizadas por meio do TFPGA (Miller, 1997), no qual a hipótese testada foi que a distribuição das frequências dos alelos seria idêntica nas populações. O programa utiliza a metodologia que emprega reamostragem numérica do tipo Cadeias de Markov.

O teste de Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar o desvio de panmixia. Para a caracterização da estrutura genética das populações, foram utilizadas as estatísticas F estimadas pelo método de Weir e Cockerham (1984). O método foi escolhido com base no conceito de amostragem aleatória,

em que as populações divergiram de um ancestral único, do qual as populações em estudo são amostras aleatórias. Com o emprego da análise de variância para cada alelo, foram obtidas estimativas para os coeficientes F , f e θ p das populações amostradas, sendo que F é o coeficiente de endogamia total, f é o coeficiente de endogamia da população e θ p é o coeficiente de coancestralidade, que mede a endogamia gerada pelo efeito de subdivisão, que é um estimador da divergência entre as populações. Além desses parâmetros, foi calculado o G_{ST} (Hedrick) para testar o efeito de divergência genética entre populações, a partir do G_{ST} de Nei obtido no software Fstat de Goudet (2001) com a seguinte expressão:

$$G_{ST\ Hedrick} = \frac{G_{ST}(1 + H_e)}{1 - H_e}; \text{ (Hedrick, 2005).}$$

Os coeficientes foram gerados com o emprego do programa GDA (Lewis e Zaykin, 1999). No programa PopGene também foram estimados os coeficientes de endogamia total F_{IT} , o coeficiente de endogamia da população F_{IS} e o coeficiente que mede a endogamia gerada pelo efeito de subdivisão F_{ST} do modelo de Wright (1978). Foram estimados os coeficientes para as nove populações. Distâncias genéticas de Nei (1978) entre populações também foram estimadas, sendo agrupadas pelo método do UPGMA para criar uma árvore de distâncias genéticas utilizando o Programa TFPGA.

Neste trabalho, o fluxo gênico foi considerado sob o conceito proposto por Ellstrand e Elam (1993) para descrever o movimento de genes entre populações diferentes e isoladas espacialmente. As medidas de fluxo gênico foram feitas mediante duas abordagens indiretas, sendo que a mais tradicionalmente usada, proposta inicialmente por Wright (1951), foi baseada na seguinte expressão:

$$m = \left(\frac{1}{4}\right) \cdot \left(\frac{1}{N_e - 1}\right)$$

sendo: m : taxa de migração, e

N_e : tamanho efetivo de indivíduos na população.

As estimativas foram obtidas neste trabalho com o valor de F_{ST} obtido entre as cinco populações de barbatimão e entre as mesmas populações, duas a duas, com base na expressão apresentada por Slatkin e Barton (1989):

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

As estimativas de fluxo gênico (Nm) foram realizadas por meio do programa PopGene. Para o cálculo de tamanho efetivo populacional (N_e) de cada população considerada isoladamente, utilizou-se a expressão:

$$N_e = \frac{N}{(1 + f)} \quad (\text{Venkovsky, 1997}),$$

em que: N : número de indivíduos adultos amostrados, e
 f : coeficiente de endogamia intrapopulacional.

Distâncias genéticas de Nei (1978) entre populações também foram estimadas, sendo agrupadas pelo método do UPGMA para criar uma árvore de distâncias genéticas utilizando o Programa TFPGA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados os *primers* de soja e de espécies arbóreas (Tabela 2), totalizando 123 *primers* avaliados. Os testes iniciais foram realizados em gel de agarose para identificar ampliações abaixo de 330 pares de bases com temperatura de anelamento de 47 °C onde foram obtidos 29 *primers* com amplificação: o gênero *Cryptomeria* é representado pelo *primer* Cjgssr83; a espécie *Euterpe edulis* apresentou três *primers*: EE15, EE23 e EE48; *Eugenia disenterica* teve os *primers* EMBRA63 e EMBRA172; a espécie *Prunus avium* também com dois *primers* (EMPas08 e EMPas12); a oliveira teve os *primers* GAPU11, GAPU59 e GAPU101; *Cherimoia* com os *primers* LMCH11, LMCH12 e LMCH13; o *Pinus* só mostrou o *primer* PSM4; a *Melaleuca alternifolia*

teve os *primers* Scu039, Scu041, Scu064, Scu127, Scu133 e Scu144; finalmente, o guapuruvú (*Schizolobium parahyba*) com os *primers* Sp1, Sp2, Sp3, Sp4, Sp5, Sp11, Sp13 e Sp15. Foram realizados, também, testes de eliminação de bandas inespecíficas por aumento da temperatura de anelamento.

Dos 29 pares de *primers* que amplificaram, 19 não eram conservados em *A. polyneuron*, apresentando muitas falhas, e 10 eram mais estáveis, sendo que EE48, GAPU101, EMBRA172 e EMPas05 foram monomórficos, enquanto Sp4, GAPU11, Sp11, Scu144, Sp1 e Scu133 foram polimórficos, dos quais o par de *primers* Sp1 mostrou dois locos microssatélites com tamanhos de bandas diferentes.

Esses resultados mostram a transferência de *primers* entre famílias botânicas, sendo o mais comum dentro de famílias (Dayanandan et al., 1997; Brondani et al., 1998; Gaiotto et al., 2001; Zucchi et al., 2003). Mesmo assim, alguns *primers* não são transferidos em algumas espécies dentro da família, mas são totalmente transferidos para outras (Dayanandan et al., 1997), ocorrendo também muitos monomórficos. Portanto, foi utilizado um número grande de *primers* para se obter algum resultado com *primers* de outras famílias que estivessem conservados em *A. polyneuron*.

Analisando a segregação alélica dos locos, observou-se que pouco desequilíbrio de segregação ocorreu (Tabela 3), sendo significativo apenas no locos GAPU11 (Teodoro Sampaio), Sp11 (Selvíria), Scu133 (Bauru e Selvíria) e ainda Scu144 e Sp1 (Botucatu). A maior diversidade alélica foi observada na população Piracicaba, com média de número de alelos de 3,0 e alelos efetivos de 2,2 em um local isolado por café, algodão e cana por décadas, enquanto a maior diversidade alélica foi observada em Teodoro Sampaio com média de alelos de 3,7 e alelos efetivos de 2,8, que é justamente o maior fragmento estudado e que não está isolado por muito tempo. O número de alelos por loco variou de três alelos (Sp4, Sp11 e Sp1) a seis alelos (Scu144), um número bem menor que o observado nas espécies originais dos microssatélites, ocorrência comum na transferência para outra espécie (Dayanandan et al., 1997). Os *primers* de Sp1 apresentaram dois locos A e B, sendo o loco A com quatro alelos em torno de 100 pares de base e o B com três alelos em torno de 70 pares de base.

Tabela 2. Pares de *primers* avaliados quanto à transferência para *A. polyneuron*.Table 2. Primer pairs tested for the transfer evaluation to *A. polyneuron*.

Espécie	<i>Primers</i>	Referência
<i>Glycine max</i>	SoyPRP1, GMRUBP, BARC-Sat9 e BARC-Sat22	Akkaya et al. (1995)
Leguminosas tropicais	Pel 1, Pel 2, Pel 3, Pel 5, Pel 6 e Pel 7	Dayanandan et al. (1997)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Scu039TT, Scu041TT, Scu045TT, Scu049TT, Scu051TT, Scu052TT, Scu056TT, Scu062TT, Scu064TT, Scu069TT, Scu127TT, Scu131TT, Scu133TT, Scu141TT e Scu144TT	Rossetto et al. (1999)
<i>Prunus avium</i>	EMPaS01 ^A , EMPaS02 ^B , EMPaS04, EMPaS05, EMPaS08, EMPaS11 ^A , EMPaS12 ^A , EMPaS13, EMPaS14 ^A e EMPaS15	Vaughan e Russel (2004)
<i>Annona cherimola</i>	LMCH1, LMCH2, LMCH3, LMCH4, LMCH5, LMCH6, LMCH11, LMCH12, LMCH13, LMCH14 e LMCH16	Escribano et al. (2004)
<i>Eugenia dysenterica</i>	EMBRA14, EMBRA63, EMBRA72, EMBRA122, EMBRA172 e EMBRA210	Zucchi et al. (2003)
<i>Olea europaea</i>	GAPU11, GAPU12, GAPU45, GAPU59, GAPU89 e GAPU101	Carriero et al. (2002)
<i>Cryptomeria japonica</i>	Cjgssr5, Cjgssr7, Cjgssr26, Cjgssr30, Cjgssr31, Cjgssr33, Cjgssr39, Cjgssr77, Cjgssr78, Cjgssr81 e Cjgssr83	Moriguchi et al. (2003)
<i>Schizolobium parahyba</i>	Sp1, Sp2, Sp3, Sp5, Sp6, Sp7, Sp8, Sp9, Sp10, Sp11, Sp12, Sp13, Sp14, Sp15 e Sp16	Kamaus et al. (2003)
<i>Eucalyptus grandis</i>	EMBRA2, EMBRA3, EMBRA4, EMBRA6, EMBRA7, EMBRA10, EMBRA11, EMBRA12 e EMBRA18	Brondani et al. (1998)
<i>Pinus strobus</i>	RPS12, RPS20, RPS25b, RPS84, RPS150 e RPS160	Echt et al. (1996)
<i>Pinus radiata</i>	PR4.6 e PR9.3	Smith e Devey (1994)
<i>Pinus contorta</i>	APC3, APC9, APC11 e APC13	Hicks et al. (1998)
<i>Pinus taeda</i>	PtTX2037, PtTX2034, PtTX3011 e PtTX3029	Elsik et al. (2000)
<i>Pinus taeda</i>	RPTest1 e PRTest9	Echt e Burns (1999)
<i>Pinus sylvestris</i>	PSM2 e PSM4	Kostia et al. (1995)
<i>Euterpe edulis</i>	EE2, EE3, EE8, EE15, EE23, EE43, EE45, EE48, EE54 e EE59	Gaiotto et al. (2001)
<i>Acer pseudoplatanus</i>	MAP10 e MAP34	Pandey et al. (2004)

Tabela 3. Número de alelos (na), número efetivo de alelos (ne) e desvio-padrão (s) nos locos, assim como os parâmetros heterozigosidade esperada (h_e), heterozigosidade observada (h_o), índice de fixação (f), tamanho efetivo (N_e) com base em 40 plantas e polimorfismo em nove populações de *A. polyneuron*.

Table 3. Number of of alleles (na), effective number of alleles (ne) and standard deviation (s) in the loci, as well as the parameters expected heterozygosity (h_e), observed heterozygosity (h_o), fixation index (f), effective size (N_e) based on 40 plants and polymorphism in nine populations of *A. polyneuron*.

Locus/população		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Sp4	na	3,0 ns									
	ne	2,9	2,3	2,6	2,9	2,3	3,0	2,6	1,7	2,7	2,9
GAPU11	na	4,0**	1,0 ns	2,0 ns	4,0 ns	4,0 ns	2,0 ns	3,0 ns	3,0 ns	3,0 ns	4,0 ns
	ne	3,2	1,0	1,1	2,2	2,0	1,5	1,7	1,4	1,4	2,7
Sp11	na	2,0 ns	2,0 ns	3,0 ns	2,0 ns	3,0 ns	3,0 ns	3,0 ns	3,0 ns	3,0*	3,0 ns
	ne	1,5	2,0	2,2	1,7	2,2	1,8	2,4	2,2	2,2	2,3
Scu133	na	4,0 ns	4,0 ns	3,0 ns	4,0**	4,0 ns	4,0 ns	3,0 ns	4,0 ns	4,0*	4,0 ns
	ne	2,4	1,9	2,1	2,6	2,6	2,4	2,1	2,4	2,8	2,4
Scu144	na	6,0 ns	6,0*	6,0 ns	6,0 ns	6,0 ns	5,0 ns	5,0 ns	5,0 ns	5,0 ns	6,0 ns
	ne	5,5	5,5	4,0	4,5	3,8	4,1	4,3	3,1	3,1	5,3
Sp1 A	na	4,0 ns	4,0*	3,0 ns	4,0 ns	2,0 ns	4,0 ns				
	ne	2,8	2,3	2,4	3,4	2,4	2,5	2,4	1,9	2,0	2,8
Sp1 B	na	3,0 ns	3,0 ns	1,0 ns	1,0 ns	1,0 ns	1,0 ns	2,0 ns	2,0 ns	1,0 ns	3,0 ns
	ne	1,8	1,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,6	1,1	1,0	1,2
Média	na	3,7	3,3	3,0	3,4	3,6	3,1	3,3	3,4	3,0	3,9
	s	(1,25)	(1,60)	(1,53)	(1,62)	(1,51)	(1,35)	(0,95)	(0,98)	(1,29)	(1,07)
Média	ne	2,8	2,3	2,2	2,6	2,3	2,3	2,4	1,97	2,2	2,8
	s	(1,30)	(1,45)	(1,01)	(1,15)	(0,84)	(1,05)	(0,89)	(0,67)	(0,77)	(1,25)
Parâmetros											
h_e		0,594	0,458	0,442	0,531	0,506	0,480	0,549	0,435	0,466	0,568
h_o		0,593	0,468	0,514	0,571	0,543	0,486	0,586	0,529	0,486	0,521
f		0,002	-0,022	-0,163	-0,075	-0,072	-0,012	-0,068	-0,215	-0,041	0,083
N_e		39,9	40,9	47,8	43,3	43,1	40,5	42,9	51,0	41,7	35,3
Polimorfismo (%)		100,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	100,0	100,0	85,7	100,0

**, * e ns: teste de Qui-Quadrado para equilíbrio de segregação.

A heterozigiosidade esperada variou de 0,442 (Piracicaba) a 0,594 (Teodoro Sampaio) (Tabela 3), que é uma componente de diversidade genética observada em microsatélites um pouco menor que *Swietenia macrophylla* (Lemes et al., 2003), que é uma espécie da Amazônia e apresentou heterozigiosidades esperadas de 0,754 a 0,812 em função de um maior número de alelos por loco, embora *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al., 2003), uma espécie de Cerrado, tenha apresentado as heterozigiosidades esperadas variando de 0,276 a 0,670 com um grande número de alelos. Em termos de variabilidade, os valores apresentados neste trabalho são altos, levando-se em conta o número de alelos observados que variou de três a seis por serem *primers* transferidos. A heterozigiosidade observada, em geral, foi maior que a esperada por população, gerando índices de fixação negativos, principalmente em populações pequenas como a de Piracicaba (-0,163) e Gália (-0,215). Na heterozigiosidade total observada ela foi menor, mostrando um índice de fixação positivo (0,0829).

Com esses resultados, o cálculo do tamanho efetivo nas populações variou de 39,9 (Teodoro Sampaio) a 51,0 (Gália) em relação aos 40 indivíduos amostrados. As possibilidades são de heterozigotos vigorosos mais viáveis na seleção natural ou mesmo de autoincompatibilidade esporofítica, pois os valores de fixação diferem da maioria das espécies arbóreas tropicais, como é o caso de *Caryocar brasiliense* estudada por Collevatti et al. (2001), cujo índice de fixação variou de 0,047 a 0,172 e *Swietenia macrophylla* (Lemes et al., 2003), variando de -0,004 a 0,100. Até mesmo o fragmento menor e mais isolado no tempo e espaço, que é Piracicaba, apresentou 47,8 de tamanho efetivo, indicando algum mecanismo de reprodução sem endogamia. Quanto à porcentagem de polimorfismo nos locos, apenas um loco monomórfico foi observado em algumas populações: GAPU11 (Botucatu) e Sp1 B (Piracicaba, Bauru, Campinas, Porto Ferreira e Selvíria), não sendo um grande diferencial de diversidade genética entre populações.

Na análise da estatística F por Weir e Cockerham (1984), cujos resultados se encontram na Tabela 4, o coeficiente de fixação médio das populações foi -0,017, não diferindo estatisticamente de zero e o mesmo ocorrendo para a fixação total (0,103).

No entanto, a fixação por divisão em populações (0,119) foi significativa acima de zero, sendo o efeito mais consistente em *A. polyneuron*, em concordância ao que já foi discutido até o momento. Pelo método de Wright (1978), a estatística F dentro de populações (F_{IS}), fixação total (F_{IT}) e por divisão (F_{ST}) foram -0,067, 0,075 e 0,134, respectivamente, sendo que F_{ST} permite calcular o fluxo gênico aparente que foi da ordem de 1,61 (Tabela 5). Zucchi et al. (2003), trabalhando com *Eugenia dysenterica*, também obtiveram um valor de F_{IS} negativo (-0,017) por esse método, indicando tendência à alogamia, sendo que os valores de F_{IT} (0,238) e F_{ST} (0,250) foram um pouco maiores, mostrando um fluxo gênico de 0,680 inferior ao obtido por *A. polyneuron* (1,612), devido a um isolamento maior entre populações de *E. dysenterica*.

Entretanto, analisando o Gst (Hedrick, 2005) que é mais apropriado para microsatélites, observa-se o valor 0,4875 que, substituindo o Fst por ele na fórmula de fluxo gênico, o valor estimado passa a 0,2629, o qual evidencia um grande isolamento genético entre populações, embora ainda com pouca fixação de alelos e endogamia. Aliado ao longo período até o início de florescimento, essa espécie pode correr o risco de diminuir sua diversidade genética na próxima geração, que é crítico ao considerar a possibilidade de ocorrer mudanças climáticas.

Isso mostra uma grande variação no comportamento das espécies na sua estrutura genética, sendo na maior parte alógamas e intermediárias (Kageyama et al., 2003), variando quanto a mecanismos de cruzamentos e parentesco entre plantas da população, de modo que *A. polyneuron* exibe uma estrutura característica de espécie alógama, ou por seleção de indivíduos heterozigotos vigorosos nas plântulas ou por mecanismos que impedem cruzamentos aparentados. Segundo Martins e Batalha (2006), *A. polyneuron* tem flor tubular de antese noturna polinizada por mariposas, que têm um voo longo podendo alcançar alguns quilômetros. A dispersão de sementes é feita pelo vento, pois a semente é alada e não atinge grandes distâncias, de modo que a síndrome de polinização poderia desenvolver um fluxo gênico, mas o isolamento deve estar acima da capacidade da síndrome.

Tabela 4. Coeficientes de fixação dentro de populações (f), de endogamia total (F) e de fixação entre populações (θ_p) de *A. polyneuron*.Table 4. Endogamy inbreeding coefficients within populations (f), total inbreeding (F), and fixation among populations (θ_p) of *A. polyneuron*.

Locus	Alelo	f	F	θ_p
Sp4	total	-0,000750	0,070391	0,071087
	2	0,032033	0,066406	0,035511
	3	0,027302	0,130984	0,106592
GAPU11	1	-0,080106	-0,001456	0,072817
	total	0,211685	0,601539	0,494541
	4	0,090795	0,246978	0,171780
	2	0,326531	0,717248	0,580155
Sp11	3	0,287237	0,683369	0,555770
	1	0,120282	0,546978	0,485037
	total	-0,008047	0,091824	0,099074
	1	0,055989	0,332280	0,292678
Scu133	3	0,020124	0,114284	0,096093
	2	-0,049892	-0,024669	0,024024
	total	-0,160557	-0,168672	-0,006992
	3	-0,069832	-0,039533	0,028321
Scu144	4	-0,060241	-0,067186	-0,006550
	1	-0,231257	-0,256337	-0,020370
	2	-0,174308	-0,189405	-0,012856
	total	0,109845	0,131056	0,023828
	1	0,112293	0,155410	0,048572
	2	0,125213	0,168722	0,049737
Sp1-A	5	0,071184	0,099337	0,030310
	4	-0,076314	-0,058255	0,016779
	6	0,137913	0,135517	-0,002780
	3	0,255655	0,257757	0,002823
	total	-0,209148	-0,121585	0,072417
	3	-0,172386	-0,023948	0,126612
Sp1-B	4	-0,082255	-0,084356	-0,001941
	2	-0,296104	-0,256888	0,030257
	1	-0,163218	-0,023924	0,119749
	total	0,027292	0,125006	0,100456
	1	-0,050889	-0,023833	0,025746
	3	0,102824	0,207258	0,116403
	2	-0,006363	0,103459	0,109127
Média	–	-0,017393	0,103411	0,118739
Reamostragens	Limites a 95% de probabilidade e 1.000 reamostragens			
	Superior	0,086571	0,291123	0,254228
	Inferior	-0,121850	-0,055011	0,032575

Tabela 5. Coeficiente de fixação dentro de populações (F_{IS}), endogamia total (F_{IT}), fixação devido à subdivisão (F_{ST}), divergência genética de Hedrick (G_{STH}), fluxo gênico (Nm) e fluxo gênico hipotético substituindo F_{ST} na fórmula por G_{ST} de Hedrick (Nm_H) entre todas as populações de *A. polyneuron*.

Table 5. Coefficient of inbreeding within populations (F_{IS}), total inbreeding (F_{IT}), fixing by subdivision (F_{ST}), genetic divergence of Hedrick (G_{STH}), gene flow (Nm) and hypothetical gene flow by replacing in the formula F_{ST} for G_{STH} (Nm_H) among all populations of *A. polyneuron*.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{STH}	Nm	Nm_H
Sp4	-0,0383	0,0558	0,0906	0,4301	2,5097	0,3313
GAPU11	0,2043	0,5584	0,4450	1,5416	0,3117	-0,0878
Sp11	-0,0724	0,0462	0,1105	0,3784	2,0121	0,4106
Scu133	-0,2117	-0,1915	0,0167	0,0589	14,7080	3,9970
Scu144	0,0354	0,1068	0,0740	0,7347	3,1297	0,0903
Sp01-A	-0,2563	-0,1264	0,1034	0,4632	2,1679	0,2898
Sp01-B	-0,0302	0,1325	0,1579	0,2449	1,3331	0,7708
Média	-0,0669	0,0747	0,1343	0,4875	1,6121	0,2629

O dendrograma de distâncias genéticas (Figura 1) mostra que elas estão abaixo de 0,07 entre as populações, excetuando Piracicaba cujo nó dista geneticamente de 0,125 das outras populações, confirmando a tendência de forte isolamento desta população, já observada nos parâmetros anteriores. São distâncias genéticas pequenas se comparada com uma espécie que apresenta isolamento entre populações, como *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al., 2003), com distâncias genéticas variando de 0,02 a 0,55 e correlacionadas com o espaço físico, enquanto no presente trabalho, as populações muito afastadas têm pequena distância genética e o inverso também ocorre. Como *A. polyneuron* é uma espécie de grande longevidade e de fluxo de síndrome de polinização em longas distâncias,

um isolamento por atividade agrícola, por longo período de tempo, seria necessário para iniciar um processo de erosão genética, como é o caso da região de Piracicaba que passou pelo cultivo de café, algodão e, recentemente, a cana-de-açúcar, remontando há quase um século. Dessa forma, essa geração já é fruto de isolamento. As outras regiões ou foram mais recentemente desmatadas e/ou existem ainda muitos fragmentos florestais próximos com a geração original antes do desmatamento. A espécie tinha alta densidade populacional no Estado de São Paulo, tanto que foi muito explorada como importante fonte de madeira para construção, corroborando os dados de Kageyama et al. (2003) que observaram que espécies com alta taxa de cruzamento e alta densidade populacional têm menor divergência entre populações.

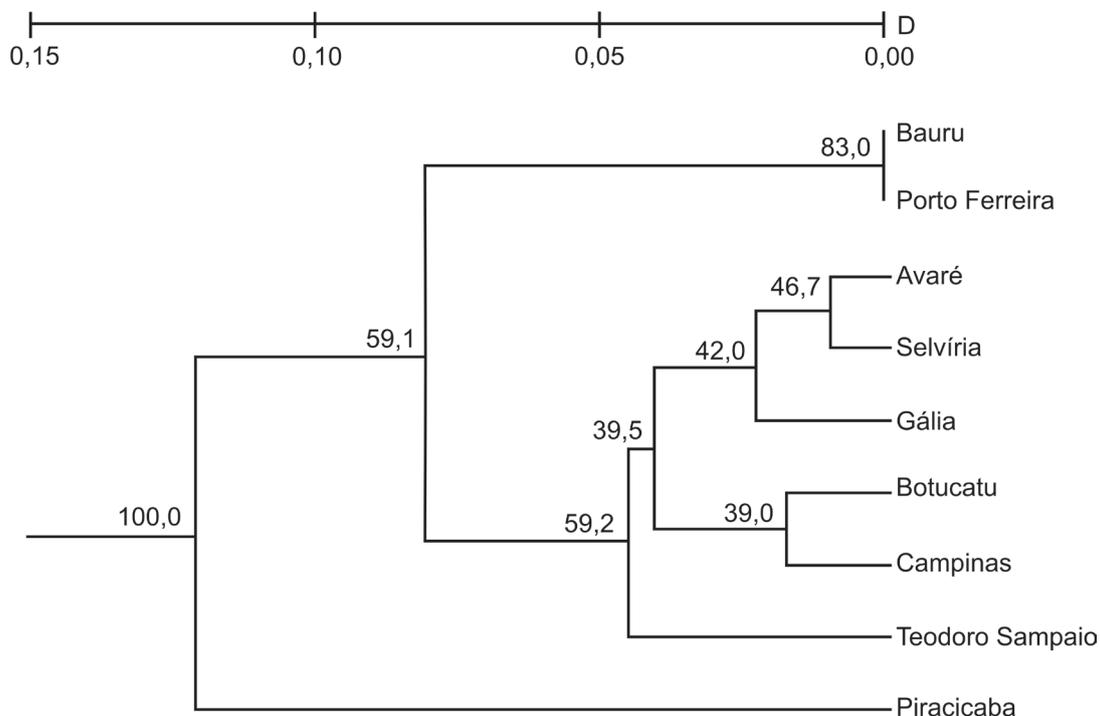


Figura 1. Dendrograma do agrupamento pelo método do UPGMA das distâncias genéticas de Nei (1978) entre populações de *A. polyneuron*, com a porcentagem de reamostragens que sustentam os nós.

Figure 1. Tree clusters of Nei (1978) genetic distances by UPGMA method among *A. polyneuron* populations with bootstraps percentage that sustained the nodes.

Frente aos objetivos deste trabalho, consideramos que *A. polyneuron* exibe estrutura genética típica de espécie alógama, com baixo coeficiente de endogamia e alta heterozigosidade, cujo tamanho efetivo permite uma coleta de indivíduos para conservação com maior tamanho efetivo e áreas menores de conservação *in situ*, em relação a outras espécies intermediárias com a mesma densidade populacional. A estatística F indica que existe isolamento entre populações, embora com pequenas distâncias genéticas entre populações, pressupondo que as coletas devam ser realizadas em vários pontos no Estado de São Paulo. Comparativamente, a população da Estação Ecológica de Ibicatu, em Piracicaba, foi a que indicou maior erosão genética e isolamento, mas, no geral, as outras populações ainda exibem a variabilidade original se observarmos os resultados do Parque Estadual do Morro do Diabo, sendo, portanto, fontes adequadas de diversidade genética para coletas visando ao trabalho de conservação e melhoramento genético.

4 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro ao projeto, aos colegas do Instituto Florestal Wilson Aparecido Contieri, Marlene Francisca Tabanez, Eliana M. R. A. Angerami, Helder Henrique de Faria e ao Prof. Mario Luiz Teixeira de Moraes, da UNESP de Ilha Solteira, pelo apoio na coleta e ao colega Alexandre Magno Sebbenn pelas sugestões de metodologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKAYA, M.S. et al. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, v. 35, p. 1439-1445, 1995.
- BRONDANI, R.P.V. et al. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.

- BUTCHER, P.A.; GLAUBITZ, J.C.; MORAN, G.F. Aplicaciones de los marcadores microsatélites en la domesticación y conservación de arboles forestales. **Recursos Genéticos Forestales**, n. 27, p. 38-47, 1999.
- BYRNE, M. et al. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. **Australian Journal of Botany**, v. 44, p. 331-341, 1996.
- CARRIERO, F. et al. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 301-307, 2002.
- COLLEVATTI, R.G. et al. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349-356, 2001.
- CORREA, P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974. v. 4, p. 460-461.
- DAYANANDAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 84, n. 12, p. 1658-1663, 1997.
- ECHT, C.S.; BURNS, R. **SSR derived from *Pinus taeda* ESTs**. Disponível em: <http://dendrome.ucdavis.edu/dendrome_genome/ssr-est.html>. Acesso em: 1999.
- _____. et al. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. **Genome**, v. 39, p. 1102-1108, 1996.
- ELLSTRAND, N.; ELAM, D. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217-242, 1993.
- ELSIK, C.G. et al. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. **Genome**, v. 43, n. 3, p. 550-555, 2000.
- ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M.A.; HORMAZA, J.I. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 746-748, 2004.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- GAJOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 1-2, p. 86-88, 2001.
- GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 2001.
- HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 1865-1893, 1982.
- HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, v. 59, p. 1633-1638, 2005.
- HICKS, M. et al. The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*). **Genome**, v. 41, n. 6, p. 797-805, 1998.
- KAGEYAMA, P.Y.; BIELLA, L.C.; PALERMO Jr., A. Plantações mistas com espécies nativas com fins de proteção a reservatório. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., Campos do Jordão, 1990. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. v. 1, p. 109-12.
- _____. et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93-107, 2003.
- KAMAUS, E.M.; MAYES, S.; BARRETT, A. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Schizolobium parahyba* (Leguminosae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 469-470, 2003.
- KOSTIA, S. et al. Microsatellite sequences in a conifer, *Pinus sylvestris*. **Genome**, v. 38, p. 1244-1248, 1995.
- LEMES, M.R. et al. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2875-2883, 2003.

- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). Disponível em: <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda>>. Acesso em: 1999.
- MARTINS, F.Q.; BATALHA, M.A. Pollination systems and floral traits in cerrado woody species of the upper Taquari Region (Central Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66(2A), p. 543-552, 2006.
- MILLER, M.P. **Tools for population genetic analysis (TGFP)**. 1.3. [S.l.: s.n.], 1997. (A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author).
- MORIGUCHI, Y. et al. Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 751-758, 2003.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.
- PANDEY, M. et al. Characterization of microsatellite markers in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 253-255, 2004.
- ROSSETTO, M. et al. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 1091-1098, 1999.
- SLATKIN, M.; BARTON, N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v. 43, p. 1349-1368, 1989.
- SMITH, D.N.; DEVEY, M.E. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. **Genome**, v. 37, p. 977-983, 1994.
- VAUGHAN, S.P.; RUSSELL, K. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 429-431, 2004.
- VENCOVSKY, R. Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY. **Proceedings...** Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. p. 21-22.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**: methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.
- _____.; COCKERHAM, C.C. Estimating F – statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.
- _____. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: Chicago University Press, 1978. 256 p. (v. 4: Variability within and among populations).
- YEH, F.C.; YANG, R. **POPGENE version 1.20**: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta, Centre for International Forestry Research, 1997.
- ZUCCHI, M.I. et al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 229-457, 2003.