

Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea stigonocarpa*
Mart. Ex Hayne na Estação Ecológica de Itirapina, SP.Spatial genetic structure of *Hymenaea stigonocarpa*
Mart. Ex Hayne in the Ecological Station of Itirapina, SP.Gabriela Rocha Defavari¹, Roberto Tarazi², Maria Andréia Moreno³,
Elza Martins Ferraz⁴, Flávio Bertin Gandara⁵ e Paulo Yoshio Kageyama⁶**Resumo**

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e considerado um “hotspot” de biodiversidade. Nos últimos anos, a preocupação com a proteção da diversidade genética de espécies vegetais tornou-se prioridade para a elaboração de estratégias de conservação, cujo objetivo é manter em longo prazo as viabilidades evolutivas. Nesse contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos relacionados à variabilidade genética dos poucos fragmentos restantes do cerrado. Para isso, o conhecimento da biologia da espécie, da dinâmica e estrutura genética das populações são fatores importantes para que se promova uma conservação genética efetiva. Dentro deste contexto, estudou-se a estrutura genética espacial de uma população natural de *Hymenaea stigonocarpa*, com uso de marcadores alozímicos. Todos os indivíduos ($n = 69$) em 680 hectares da Estação Ecológica de Itirapina, Itirapina, SP foram mapeados e genotipados. A população apresentou altos níveis de diversidade genética ($H_o = 0,236$). Porém, o índice de fixação foi alto e significativo ($f^2 = 0,106$), indicando a ocorrência de endogamia. Além disso, a população apresentou indivíduos com genótipos idênticos, sugerindo a ocorrência de propagação vegetativa. A população encontra-se altamente estruturada espacialmente por irmãos-completos ($\theta_{xy} = 0,250$), localizados até 2 m de distância, devido provavelmente a um baixo fluxo gênico e aliado a um forte efeito fundador.

Palavras-chave: *Hymenaea stigonocarpa*, Jatobá-do-cerrado, Estrutura genética espacial intrapopulacional, Alozimas

Abstract

The “cerrado” (Brazilian savanna) is the second largest Brazilian biome and it is considered a biodiversity hotspot. In recent years, the concern with the protection of genetic diversity of the plant species has become priority for the conservation strategies, which aims to maintain the long-term evolutionary viability of these species. In this context, it is essential to develop studies related to the genetic variability of the few remaining fragments of the “cerrado”. Therefore, the knowledge of the biology of the species, the dynamics and the genetic structure of the populations are important factors for promoting efficient genetic conservation. For this reason, the spatial genetic structure of a natural population of *Hymenaea stigonocarpa* was studied with the use of allozyme markers. All individuals ($n = 69$) occurring on 680 hectares of the Ecological Station of Itirapina, Itirapina, SP were mapped and genotyped. The population showed high levels of genetic diversity ($H_o = 0.236$). However, it exhibited a high and significant fixation index ($f^2 = 0.106$), indicating the occurrence of inbreeding. In addition, individuals with identical genotypes were found in the population, suggesting the occurrence of vegetative propagation. The population was highly structured by full-sibs ($\theta_{xy} = 0.250$), located up to 2 m apart due to a restricted gene flow in combination with a strong founder effect.

Keywords: *Hymenaea stigonocarpa*, Jatobá-do-cerrado, Spatial genetic structure, Allozyme

¹Pesquisadora do Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: gabidefavari@terra.com.br

²Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: betotarazi@yahoo.com.br

³Mestranda em Recursos Florestais do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: amoreno@esalq.usp.br

⁴Coordenadora Técnica do Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: emferraz@esalq.usp.br

⁵Professor do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: fgandara@esalq.usp.br

⁶Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP - 13418-900 - E-mail: kageyama@esalq.usp.br

INTRODUÇÃO

O cerrado é o segundo maior bioma do país, ocupando originalmente 25% do território brasileiro, o equivalente a 204 milhões de hectares. Apesar de ser considerado um “hotspot”, rico em biodiversidade e endemismo, este ecossistema está ameaçado por atividades antrópicas (MYERS *et al.*, 2000) que já destruíram aproximadamente 55% da área original (KLINK e MACHADO, 2005). No Estado de São Paulo a situação é ainda mais alarmante, pois o cerrado cobria 32% do território e hoje restam menos de 215.000 hectares ou 0,86% da superfície original, distribuídos em pequenos fragmentos isolados (KRONKA, 2005). Nesse contexto, o desenvolvimento de estudos sobre ecologia e manejo das espécies vegetais do cerrado é necessário para a recuperação deste bioma, uma vez que as técnicas de recuperação florestal, atualmente conhecidas, não se aplicam com eficácia ao cerrado (DURIGAN, 2003).

Da mesma forma, torna-se imprescindível gerar informações relacionadas com variabilidade genética dos poucos fragmentos restantes. Para isso, a escolha de espécies-modelo, o conhecimento da biologia das espécies, da dinâmica e estrutura das populações são fatores importantes para que se promova uma conservação genética eficiente (KAGEYAMA *et al.*, 2001). Para tanto, escolheu-se estudar *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne. (jatobá-do-cerrado), pertencente à família Leguminosae (Caesalpinieaceae), por tratar-se de uma espécie de ampla distribuição e ocorrência em formações abertas do cerrado e campo cerrado.

Segundo Gibbs *et al.* (1999), *H. stigonocarpa* é predominantemente alógama e apresenta auto-incompatibilidade com indícios de seleção pós-zigótica nas flores autofecundadas. A espécie é polinizada por pelo menos três gêneros de morcegos, incluindo *Glossophaga soricina*, *Platyrrhinus lineatus* e *Carolilia perspicillata*. Além de representar um papel ecológico fundamental, por produzir anualmente grande quantidade de sementes que servem de alimento para a fauna terrestre (LORENZI, 2002). Essas características são importantes para programas de restauração florestal, uma vez que *H. stigonocarpa* está entre as espécies recomendadas por Durigan (2003) para plantio em regiões de cerrado, em condições de solo bem drenado.

Visando subsidiar estratégias para conservação de *H. stigonocarpa*, o presente estudo teve

como objetivo quantificar os níveis de diversidade genética e estudar a distribuição espacial de genótipos de uma população natural no Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo e amostragem

A área de estudo, uma parcela de 680 ha (4.000 m x 1.700 m) está localizada na Estação Ecológica de Itirapina (EEI), (22°15'S; 47°49'W) pertencente ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo. A área total da EEI é de 2.300 ha, abrangendo vegetação natural de campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado, banhados e matas ciliares ao longo dos cursos d'água (SILVA, 2005). O entorno da EEI inclui monoculturas de *Eucalyptus* spp., *Pinus* spp., *Saccharum* spp. e citros, além de pastagens, da Represa do Broa e de 300 ha de campo cerrado fazendo divisa ao nordeste (DELGADO, 1994).

Para o estudo de estrutura demográfica foi realizado um censo em 680 ha, no qual todos os indivíduos de *H. stigonocarpa*, independente do tamanho ou fase de desenvolvimento, foram mapeados com auxílio de um aparelho GPS (Garmin GPS Map 76S). A altura das árvores foi mensurada com régua dendrométrica e a circunferência na altura da base (CAB) com fita métrica. Para realização de análises genéticas, com marcadores bioquímicos codominantes (alozimas), foram utilizadas folhas jovens coletadas de todos os indivíduos.

Procedimentos laboratoriais

A análise da diversidade genética foi realizada com marcadores alozímicos no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP. A eletroforese foi horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%. O protocolo de revelação das alozimas foi determinado com base em Kephart (1990) e Alfenas (1998). Inicialmente, foram testados 21 sistemas enzimáticos nos tampões de eletrodo/gel Citrato Morfolina (CM, pH 6,1/7,1) e Tris-Citrato (TC, pH 7,5/7,5). As enzimas foram extraídas macerando-se as folhas com nitrogênio líquido e utilizando o tampão de extração número 1 de Alfenas (1998). As combinações com melhores resultados foram utilizadas para a análise da diversidade genética da população em estudo. A partir desses resultados adotou-se como pro-

tocolo padrão o tampão de eletrodo/gel Citrato Morfolina (CM) e os sistemas enzimáticos: Esterase (α -EST – EC.3.1.1.1), Fosfatase ácida (ACP – EC.3.1.3.2), Diaforase (DIA – EC.1.6.4.3), Isocitrato desidrogenase (IDH – EC.1.1.142), Enzima málica (ME – EC.1.1.1.40), Fosfoglucomutase (PGM – EC.2.7.5.1), Glucose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH – EC.1.1.1.49), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH – EC.1.1.1.44), Peroxidase (PO – EC.1.11.1.7) e Fosfoglucoose isomerase (PGI – EC.5.3.1.9).

Análise da estrutura demográfica

Foi calculada a densidade de indivíduos por hectare e a média para altura e CAB. O programa computacional SGS (DEGEN *et al.*, 2001) foi utilizado para a obtenção da distância média do vizinho mais próximo (R_o) e do índice de dispersão (R) conforme Clark e Evans (1954): $R = R_o / R_e$. Se $R = 1$, a distribuição é aleatória; $R < 1$, a distribuição é agregada e $R > 1$, a distribuição é uniforme. Sendo assim, $R_o = \sum r_i / n$ = distância média observada do vizinho mais próximo, r_i = distância do vizinho mais próximo e n = número de observação. $R_e = 1 / 2\sqrt{d}$ = distância esperada do vizinho mais próximo e d = densidade média de indivíduos/ha. Para testar a significância estatística de R foi utilizado o teste Z , em que, s é o desvio padrão: $Z = |R_o - R_e| / s$.

Análise da diversidade genética

As estimativas das frequências alélicas, juntamente com a percentagem de locos polimórficos (P), do número de alelos por loco (A), das heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e), e do índice de fixação (f) foram realizadas empregando-se o programa GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2001). O intervalo de confiança do valor médio de f foi construído utilizando-se 10.000 reamostragens bootstrap sobre locos. O teste de aderência às proporções do modelo equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo teste exato de Fisher e, para verificar a significância, foi empregado o método de Cadeias de Markov utilizando-se o programa TFGA (MILLER, 1997).

Estimativa da diversidade clonal

O programa GenClone 2.0 (ARNAUD-HAOND e BELKHIR, 2007) foi utilizado para os cálculos relacionados com a discriminação de clones, estimativa da diversidade e heterogeneidade clonal. Genete (indivíduo gerado por um zigoto) e ramete (parte potencialmente independente de um genete) (SILVERTOWN, 2008)

foram discriminados através do método proposto por Young *et al.* (2002), que leva em consideração o coeficiente de endogamia de Wright (1951). Desta forma, a probabilidade de genótipos multilocos distintos serem idênticos ao acaso foi dado por: $p_{gen}(F_{IS}) = \prod_{i=1}^l [(f_i g_i) / (1 + (z_i (F_{IS(i)})))^2]^{2h}$. Em que, i representa o número de locos, h o número de locos heterozigóticos, f_i e g_i são as frequências alélicas dos alelos f e g no i^{imo} loco (quando f e g foram idênticos para homozigotos, $F_{IS(i)}$ e F_{IS} foram estimados para o i^{imo} loco através do método de reamostragem round-robin. Para locos homozigóticos $z_i = 1$ e para locos heterozigóticos $z_i = -1$).

A diversidade clonal (D_c) foi calculada de acordo com Dorken e Eckert (2001), dada por: $\hat{D}_c = G - 1 / N - 1$. Em que, G = número de genes encontrados na amostra e N = número total de rametes amostrados. A heterogeneidade clonal (\hat{H}_c), ou a maneira como está distribuída essa diversidade pelas linhagens clonais foi calculada segundo Arnaud-Haond *et al.* (2007): $\hat{H}_c = 1 - L$, em que $L = \sum_{i=1}^{Gl} [n_i(n_i - 1) / N(N - 1)]$. Nessa fórmula, Gl = número de linhagens multilocos detectados em uma amostra, n_i = número de amostras dentro das linhagens multiloco e N = número total de rametes amostrados. A magnitude de \hat{H}_c varia de 0 a 1 - (1/Gl).

Estimativa do tamanho efetivo

Foi estimado o tamanho efetivo populacional (N_e) conforme Sebbenn e Seoane (2005), envolvendo as estimativas do índice de fixação e dos coeficientes de coancestria: $N_e = 0,5n^2 / (1 + \hat{f})(0,5n + \sum_{x=1}^n \sum_{y \neq 1}^n \hat{\theta}_{xy})$. Em que, $\sum_{x=1}^n \sum_{y \neq 1}^n \hat{\theta}_{xy}$ = soma de todas as estimativas das coancestrias entre os pares de indivíduos de uma população, n = tamanho amostral e \hat{f} = estimativa do índice de fixação da população.

A área mínima viável (AMV) para conservação genética *in situ* foi estimada em função do tamanho efetivo de referência ($N_{e(ref)} = 1000, 500$ e 50) proposto por Lynch (1996): $AMV = N_{e(ref)} / d(\hat{N}_e / n)$ em que, \hat{N}_e / n = relação entre tamanho efetivo e tamanho amostral e d = densidade de indivíduos por hectare.

Análise de gargalos genéticos

Para a detecção de reduções recentes no tamanho efetivo populacional, foi utilizado o programa computacional BOTTLENECK (PIRY *et al.*, 1999), com o Modelo de Alelos Infinitos (MAI) de Maruyama e Fuerst (1985), por este ser apropriado para locos alozímicos. Foi reali-

zado o teste de significância de Wilcoxon com 1.000 iterações (Luikart e Cornuet, 1998). O programa BOTTLENECK (PIRY *et al.*, 1999) testou a hipótese de $H_e > H_{eq}$ sob MAI, sendo H_e = heterozigosidade esperada calculada a partir das freqüências alélicas e H_{eq} = heterozigosidade esperada no equilíbrio entre mutação e deriva calculada a partir do número de alelos.

Estimativa da estrutura genética espacial intrapopulacional

Para a análise da estrutura genética espacial intrapopulacional, foi utilizado o programa SPAGE-DI (HARDY e VEKEMANS, 2002). A caracterização da distribuição espacial dos genótipos dentro da população foi realizada a partir das estimativas dos coeficientes de coancestria (θ_{xy}) entre pares de plantas, dentro de diferentes classes de distância. O coeficiente de coancestria foi calculado com base no método de Loiselle *et al.* (1995), conforme descrito por Bittencourt e Sebbenn (2007):

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk})(p_{yjk} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k (1 - \bar{p}_{lk}) \bar{p}_{lk}} + \left[\frac{1}{\sum_l (2n_l - 1)} \right]$$

Sendo p_{xlk} e p_{yjk} = freqüências do alelo k no loco l 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}_{lk} = média da freqüência do alelo k no loco l na subpopulação com n_l (número de genes) no loco l . Para obter o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foram realizadas 10.000 permutações de genótipos entre sete classes de distância de um metro.

Além da obtenção do correlograma do coeficiente de coancestria (θ_{xy}) pelas classes de distâncias, foi analisado o mesmo coeficiente para todas as combinações entre pares de plantas com intuito de verificar a distância máxima na qual os indivíduos encontravam-se relacionados no grau de irmãos-completos ($\theta_{xy} = 0,25$), meios-irmãos ($\theta_{xy} = 0,125$) e primos ($\theta_{xy} = 0,0625$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estrutura demográfica

Na área estudada foram encontrados 69 indivíduos de *H. stigonocarpa*, os quais apresentaram

altura média de 3,33 m, variando de 0,56 a 5,7 m; CAB média de 26,21 cm, variando de 1,6 a 64 cm e densidade populacional de 0,1 indivíduo por hectare. Os tamanhos máximos para altura, CAB e densidade foram muito abaixo daqueles encontrados para a média da espécie (CARVALHO, 2007), provavelmente relacionados com restrições edáficas encontradas na EEI, que é formada por Neossolos arenosos (SILVA, 2005) e com a ocorrência de vários eventos de queimadas observados, pelo menos, nos últimos dez anos (MOTTA-JUNIOR *et al.*, 2008).

Na população EEI, a maioria dos indivíduos estava disposta em reboleiras, ou seja, as árvores formavam agrupamentos de três a 29 plantas (Tabela 1). Contudo, três indivíduos ocorreram de forma isolada (Pontos 7, 8 e 10; Figura 1). A distância média do vizinho mais próximo (R_o) entre indivíduos foi de 18,94 m, variando de 0,09 m a 3.793 m e o índice de dispersão para os indivíduos foi significativo ($R = 0,144$), indicando um alto grau de agregação. Segundo Condit *et al.* (2000), a maioria das espécies vegetais tropicais ocorre de forma agregada. A agregação em reboleiras pode ser causada em parte pela dispersão restrita de sementes, fatores edáficos ou ainda por propagação vegetativa. Segundo Bulhão e Figueiredo (2002), a ocorrência de propagação vegetativa ocorre em poucas espécies leguminosas que exibem raízes diagravitrópicas que crescem paralelamente à superfície do solo. Estes autores constataram que *H. stigonocarpa* apresenta propagação vegetativa. Assim, a sobrevivência da espécie, aparentemente, além de depender da produção regular de sementes, germinação e estabelecimento de plântulas, tem a vantagem de estabelecer-se por propagação vegetativa.

A R_o entre reboleiras foi de 345,4 m, variando de 16 a 3.793 m e o índice de dispersão para as reboleiras foi não significativo ($R = 0,799$), demonstrando uma distribuição aleatória das reboleiras pela área (Figura 1). Como a EEI é na sua maioria composta por Neossolos arenosos bem drenados (SILVA, 2005), não haveria diferencial para germinação e estabelecimento de plântulas de acordo com o tipo de solo; desta forma a distribuição das reboleiras foi aleatória.

Tabela 1. Número de indivíduos de *H. stigonocarpa* encontrados em cada reboleira (ponto) na Estação Ecológica de Itirapina, SP.

Pontos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de indivíduos	7	13	3	4	7	3	1	1	29	1

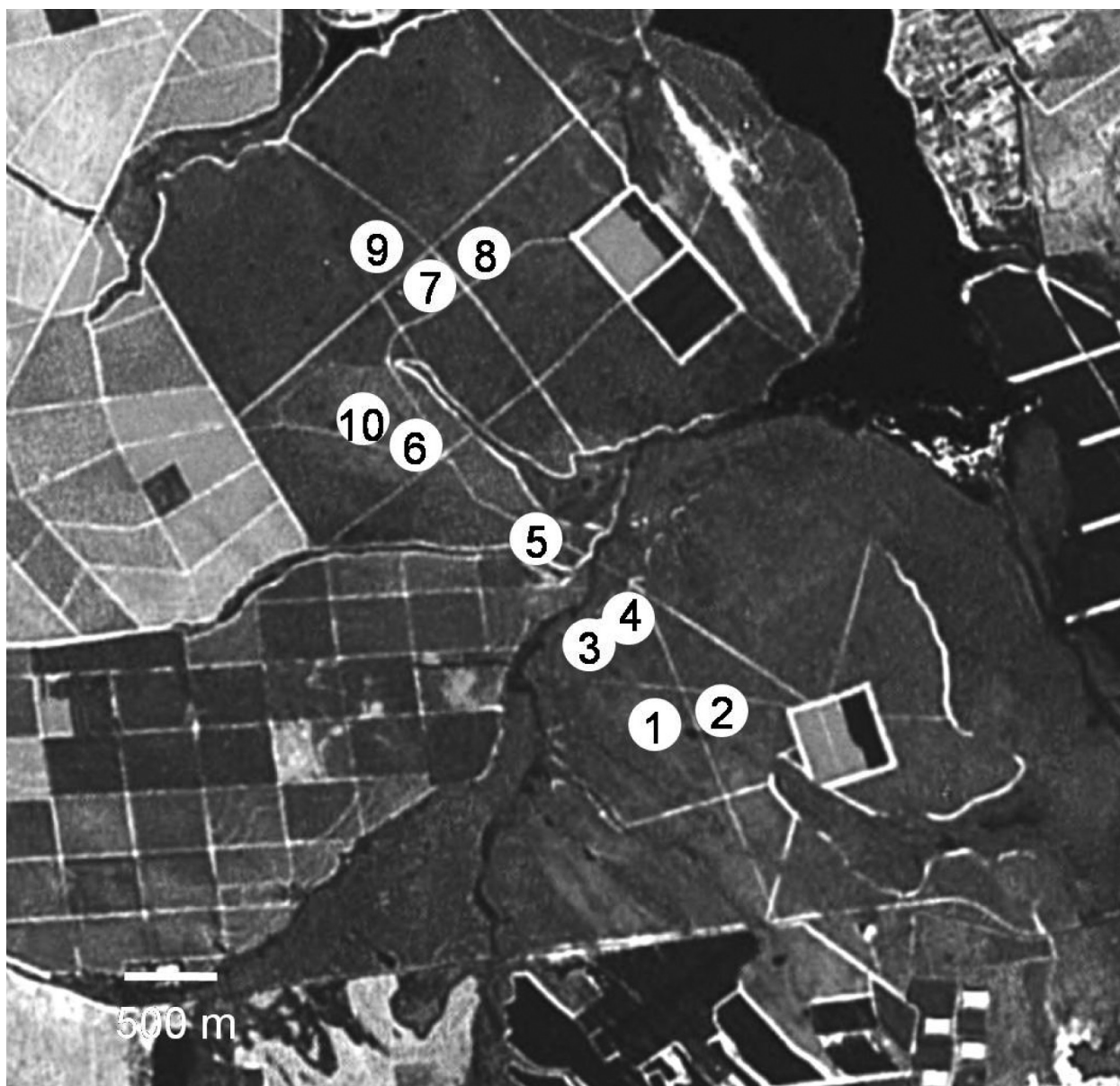


Figura 1. Distribuição espacial de todos os pontos, onde se localizam as árvores de *H. stigonocarpa* na população.
Figure 1. Spatial distribution of all tree location spots of *H. stigonocarpa* in the population.

Estrutura genética

Foram encontrados 23 alelos nos 13 locos estudados, sendo quatro deles monomórficos e nove polimórficos. O número médio de alelos por loco ($\hat{A} = 1,8$) foi similar ao valor encontrado para a média de várias espécies vegetais (HAMRICK *et al.*, 1992). Entretanto,

a porcentagem de locos polimórficos ($\hat{P} = 69,2\%$) e os valores da diversidade genética ($\hat{H}_o = 0,236$) foram superiores aos relatados para espécies tropicais (HAMRICK e LOVELESS, 1986b; HAMRICK *et al.*, 1992), porém semelhantes a outras espécies nativas do cerrado (Tabela 2).

Tabela 2. Índices de diversidade genética de espécies do cerrado utilizando locos alozímicos.

Table 2. Genetic diversity indexes for cerrado species using allozyme loci.

Espécie	\hat{P}	\hat{A}	\hat{H}_o	\hat{H}_e	Autor
<i>Eugenia dysenterica</i>	83,0	3,01	0,188	0,282	Telles, 2000
* <i>Caryocar brasiliense</i>	100	2,80	0,720	0,499	Melo Júnior et al., 2004
<i>Eremanthus erythropappus</i>	76,9	2,30	0,299	0,399	Barreira, 2005
<i>Solanum lycocarpum</i>	-	1,93	0,201	0,270	Moura, 2007
<i>H. stigonocarpa</i>	69,2	1,80	0,236	0,264	presente estudo

N: número médio de indivíduos amostrados na população, \hat{P} : porcentagem de locos polimórficos, \hat{A} : média de alelos por loco, \hat{H}_e : heterozigosidade esperada, \hat{H}_o : heterozigosidade observada, *apenas locos polimórficos analisados no estudo.

O nível de heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e = 0,264$) indicou uma alta variabilidade genética. Porém, o alto e significativo índice de fixação ($\hat{f} = 0,106$) apontou a ocorrência de endogamia. Contrastes semelhantes entre estes parâmetros também foram constatados por Moraes *et al.* (2007) em duas populações de *H. stigonocarpa*, utilizando marcadores microssatélites. Esses autores correlacionaram a alta endogamia a um sistema misto de reprodução (cruzamentos e autofecundações), com predomínio de cruzamentos entre árvores aparentadas, gerando endogamia biparental e produzindo uma alta quantidade de progênies de irmãos-completos.

Na população EEI a alta endogamia, aliada a um reduzido número de indivíduos, sugere um forte efeito fundador. Fato confirmado pelo resultado da análise gerada pelo programa BOTTLENECK (PIRY *et al.*, 1999), na qual oito dos nove locos polimórficos apresentaram $H_e > H_{eq}$. Segundo Piry *et al.* (1999), quando $H_e > H_{eq}$ surgem indícios de que ocorreu deriva devido à redução populacional. Populações que tiveram reduções recentes no tamanho efetivo exibem uma redução do número de alelos e da heterozigosidade nos locos polimórficos. Sendo que a redução no número de alelos ocorre mais rapidamente do que a redução na H_e .

O efeito fundador usualmente ocorre em uma população originada por um ou poucos genótipos (FUTUYMA, 1992). Ramos *et al.* (2005) utilizando marcadores cloroplastidiais revelou, em uma população próxima da EEI, uma dominância de um único haplótipo (linhagem ma-

terna), fato que corrobora com uma hipótese para o efeito fundador na EEI: colonização de propágulos gerados por mães com a mesma ascendência. Com poucos genótipos originando a população EEI, todas as características de biologia reprodutiva da espécie caracterizada por Gibbs *et al.* (1999) (alogamia, auto-incompatibilidade, síndrome de polinização em longas distâncias) não conseguem contrapor à endogamia local, a menos que houvesse a introdução de novos alelos na população a partir da imigração de sementes e pólen. Esses novos alelos poderiam estar presentes na própria EEI, fora da parcela de 680 ha, ou em fragmentos de cerrado no entorno e próximos da EEI. Contudo, Durigan *et al.* (2002) não encontraram indivíduos de *H. stigonocarpa* num fragmento de cerrado contíguo à EEI com área aproximada de 300 ha, indicando raridade desta espécie na região.

No teste exato de Fisher para o Equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW), sete dos nove locos polimórficos (78%) não aderiram às proporções esperadas pelo modelo. O alto e significativo índice de fixação (\hat{f}) e a não aderência às proporções esperadas podem ser também explicados pelo Efeito Wahlund, gerado pela subdivisão da população em reboleiras. O Efeito Wahlund mede o grau de subdivisão da população como um todo e tende a reduzir a frequência de heterozigotos (FUTUYMA, 1992). O efeito das subdivisões (reboleiras) dentro da própria população foi possivelmente causado por fenômenos microevolutivos, tais como a agregação, dispersão e propagação vegetativa.

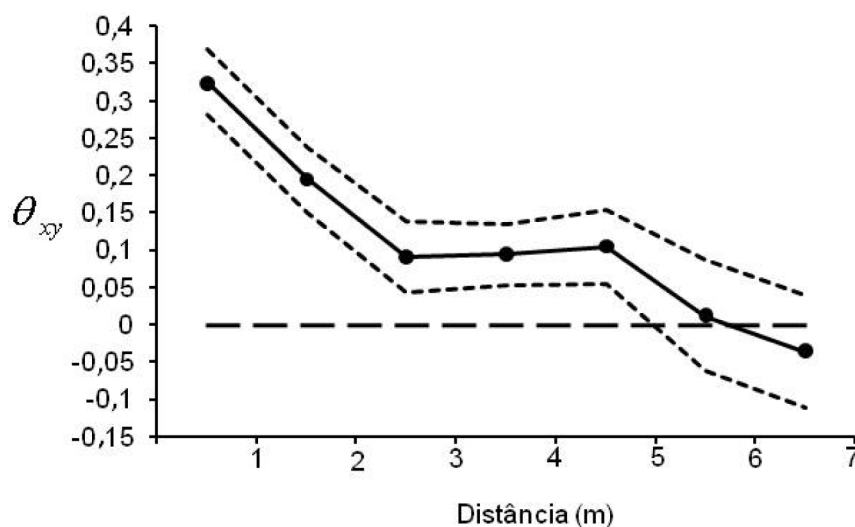


Figura 2. Dendrograma representativo do coeficiente de coancestria (θ_{xy}) em sete classes de distância (m) entre árvores de *H. stigonocarpa*. (A linha tracejada indica o valor nulo de θ_{xy} e as linhas pontilhadas indicam o limite do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade, estimado por 10.000 permutações sobre alelos e localização).

Figure 2. Dendrogram plotting the coancestry coefficient (θ_{xy}) in seven distance classes (m) among trees of *H. stigonocarpa*. (The dashed line indicates the null value, and the dotted lines indicate the limits of the 95% confidence interval drawn from 10,000 permutations over genes and location).

A estrutura genética espacial demonstra uma nítida estruturação de genótipos até 5 m de distância, raio equivalente ao do tamanho médio das reboleiras. Até 1 m, os indivíduos são parentes no grau de irmãos-clonais, de 1 até 2 m são irmãos-completos e de 2 até 5 m, os indivíduos são aparentados, provavelmente provenientes da mesma mãe, porém com pólen vindo de outro lugar (Figura 2).

Analisando o coeficiente de coancestria entre todos os pares de plantas foi encontrada uma forte estruturação espacial em longas distâncias, até 3.793 m para indivíduos relacionados no grau de irmãos-completos ($\hat{\theta}_{xy} \cong 0,250$). Essa relação refere-se a seis indivíduos da reboleira n°2 com doze indivíduos da reboleira n°9. Devem ser considerados ao menos três fenômenos atuantes nessa alta estruturação espacial. O primeiro está relacionado com um forte efeito fundador e poucos genótipos disponíveis na população para os cruzamentos, fenômeno discutido anteriormente. O segundo é a síndrome de polinização realizada por morcegos, na qual Heithaus *et al.* (1975) propuseram que esses polinizadores promovem fecundação cruzada a longas distâncias. O terceiro fenômeno está relacionado com a dispersão de sementes, na qual as sementes levadas a longas distâncias podem ser dispersas de forma agrupada, alterando a distribuição de indivíduos e genótipos (HAMRICK e LOVELESS, 1986a).

Dos 69 indivíduos presentes na área, 46 foram genetes e 23 rametes. A estimativa de diversidade clonal ou proporção de genetes existentes encontrada na população foi moderada ($\hat{D}_c = 0,69$). Nenhum ramete foi alocado fora de sua reboleira e os pontos que apresentaram rametes foram 1, 2, 4, 5 e 9, sendo que o ponto 9 apresentou o maior número de genetes com rametes ($n = 10$). Em média, cada genete apresentou um par de rametes. A distância média entre rametes foi de 1,80 m, variando de 0,14 m até 10,04 m. Dentro das reboleiras foi constatada baixa diversidade com predomínio de alguns genótipos, indicando que as mesmas foram colonizadas por poucos propágulos. Esse

fato está coerente com o alto valor encontrado para a heterogeneidade clonal ($\hat{H}_c = 0,987$), mostrando que os genótipos encontravam-se distribuídos entre as diferentes reboleiras dentro da população.

O tamanho efetivo da população foi calculado apenas para os genetes, para isso foi necessário recalcular o índice de fixação ($\hat{f} = 0,157$), que apresentou uma elevação no valor comparado à estimativa anterior gerada pelo conjunto de genetes e rametes. Segundo Stoeckel *et al.* (2006), o índice de fixação é usualmente afetado quando há clones na amostra. Assim, o tamanho efetivo populacional foi estimado em dez indivíduos, demonstrando uma baixa representatividade genética e risco de extinção em curto prazo (10 gerações) devido a possíveis efeitos deletérios gerados pela endogamia (FRANKEL e SOULÉ, 1981). Baseando-se no tamanho efetivo de referência (1000, 500 e 50) e na densidade de genetes ($d = 0,068$), a AMV para a EEI foi de 65.635, 32.871 e 3282 ha, respectivamente (Tabela 3). A área total da Estação Ecológica de Itirapina é de 2.300 ha, portanto para a conservação do potencial adaptativo de *H. stigonocarpa* em curto prazo, seriam necessárias pelo menos uma vez e meia a área total da Estação Ecológica de Itirapina.

CONCLUSÕES

A população EEI encontra-se altamente estruturada a curta distância.

Foram encontrados indivíduos geneticamente idênticos na população, sugerindo a ocorrência de propagação vegetativa.

Na população EEI a coleta de sementes de *H. stigonocarpa* para bancos de germoplasma e restauração florestal deve ser realizada em indivíduos localizados em diferentes reboleiras.

Na Estação Ecológica de Itirapina, há necessidade imediata de expansão de áreas para conservar a população de *H. stigonocarpa* ou, ainda, a formação de corredores de fluxo gênico para a entrada de novos alelos na população, contrapondo os efeitos gerados pela endogamia e deriva genética.

Tabela 3. Estimativa do tamanho efetivo e área mínima viável para conservação de caracteres evolutivos dos genetes de *H. stigonocarpa*.

Table 3. Estimates of the effective size and minimum viable area for conservation of the evolutionary traits of *H. stigonocarpa* genets.

N	\hat{N}_e	d	$AMV_{(ref\ 1000)}$	$AMV_{(ref\ 500)}$	$AMV_{(ref\ 50)}$
46	10	0,068	65.635	32.871	3.282

N : número de genetes; \hat{N}_e : tamanho efetivo; d : densidade de genetes por hectare; $AMV_{(ref\ 1000, 500\ e\ 50)}$: área mínima viável em hectares com o tamanho efetivo de referência de 1000, 500 e 50 indivíduos

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Iniciação Científica de Gabriela Rocha Defavari (Proc.2006/06238-5) e pela bolsa de doutorado de Roberto Tarazi (Proc.2006/04490-9); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa de Paulo Yoshio Kageyama; ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo (IF) pela licença de coleta e utilização da área (Proc.44.184/2006) e aos revisores anônimos que fizeram críticas construtivas e enriqueceram o artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. (Eds.) **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1998. 242p.
- ARNAUD-HAOND, S.; BELKHIR, K. GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology*, Oxford, v.7, p.15-17, 2007.
- ARNAUD-HAOND, S.; DUARTE, C.M.; ALBERTO, E.; SERRÃO, E.A. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, Oxford, v.16, p.5115-5139, 2007.
- BARREIRA, S. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish como base para o manejo florestal**. 2005. 61p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity*, London, v.99, p.580-591, 2007.
- BULHÃO, C.F.; FIGUEIREDO, P.S. Fenologia de leguminosas arbóreas em uma área de cerrado marginal no nordeste do Maranhão. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.25, n.3, p.361-369, 2002.
- CARVALHO, P.E.R. Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*). *Circular Técnica Embrapa Florestas*, Colombo, n.133, 2007.
- CLARK, P.J.; EVANS, F.C. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. *Ecology*, Ithaca, v.35, n.4, p.445-453, 1954.
- CONDIT, R.; ASHTON, P.S.; BAKER, P.; BUNYAVEJCHEWIN, S.; GUNATILLEKE, S.; GUNATILLEKE, N.; HUBBELL, S.P.; FOSTER, R.B.; ITOH, A.; LEFRANKIE, J.V.; LEE, H.S.; LOSOS, E.; MANOKARAN, N.; SUKUMAR, R.; YAMAKURA, T. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. *Science*, Washington, v.288, n.5470, p.1414-1418, 2000.
- DEGEN, B.; PETIT, R.; KREMER, A. SGS - Spatial Genetic Software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. *Journal of Heredity*, Washington, v.92, n.5, p.447-448, 2001.
- DELGADO, J.M. (Coord.). **Plano de manejo integrado das unidades de Itirapina, SP**. São Paulo: Instituto Florestal, 1994.
- DORKEN, M.E.; ECKERT, C.G. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology*, Oxford, v.89, p.339-350, 2001.
- DURIGAN, G. Bases e diretrizes para a restauração da vegetação de cerrado. In: KAGEYAMA, P.Y.; OLIVEIRA, R.E.; MORAES, L.F.O.; ENGEL, V.E.; GANDARA, F.B. (eds.) **Restauração ecológica de sistemas naturais**. Botucatu: FEPAP, 2003. p.187-204.
- DURIGAN, G.; NISHIKAWA, D.L.L.; ROCHA, E.; SILVEIRA, E.R.; PULITANO, F.M.; REGALADO, L.B.; CARVALHAES, M.A.; PARANAGUÁ, P.A.; RINIERI, V.E.L. Caracterização de dois estratos da vegetação em uma área de cerrado no Município de Brotas, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v.16, n.3, p.251-262, 2002.
- FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- GIBBS, P.E.; OLIVEIRA, P.E.; BIANCHI, M.B. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat pollinated tree of the Brazilian cerrados. *International Journal of Plant Science*, Chicago, v.160, n.1, p.72-78, 1999.

- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T.H. (Eds.) **Frugivores and seed dispersal**. New York: Junk Publishers, 1986a. p.17-59
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isozymes variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, Lawrence, v.18, n.3, p.201-207, 1986b.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAM-BROYLES, S.L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, Amsterdam, v.6, n.45, p.95-124, 1992.
- HARDY, O.J.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Loughborough, v.2, p.618-620, 2002.
- HEITHAUS, E.R.; FLEMING, T.H.; OPLER, P.A. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a sazonal tropical forest. **Ecology**, Ithaca, v.56, p.841-854, 1975.
- KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOVSKY, R. Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.64, p.93-107, 2001.
- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, New York, v.77, n.5, p.693-712, 1990.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Cambridge, v.19, n.3, p.707-713, 2005.
- KRONKA, F.J.N. (Ed.) **Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo**. São Paulo: SMA/IF/Imprensa Oficial, 2005. 199 p.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **GDA - Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data: version 1.0 (d16c)**. 2001. Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Acesso em 15/07/2007.
- LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, New York, v.82, n11, p.1420-1425, 1995.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 173p.
- LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, Cambridge, v.12, n.1, p.228-237, 1998.
- LYNCH, M. A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In: AVISE, J.; HAMRICK, J. (Eds.) **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. p.471-501
- MARUYAMA, T.; FUERST, P.A. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics: 2- number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. **Genetics**, Bethesda, v.111, p.675-689, 1985.
- MELO JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* CAMB.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.66, p.56-65, 2004.
- MILLER, M.P. **Tools for population genetics analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. 1997. Disponível em: <http://www.marksgeneticssoftware.net/>. Acesso em: 22 abr. 2008.
- MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em pequenas populações fragmentadas e em árvores isoladas de *Hymenaea stigonocarpa*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.74, p.75-86, 2007.
- MOTTA-JÚNIOR, J.C.; GRANZINOLLI, M.A.M.; DEVELEY, P.F. Aves da estação ecológica de Itirapina, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v.8, n.3, p.207-227, 2008.
- MOURA, T.M. **Estrutura genética populacional em lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hil., Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás**. 2007. 97p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, London, v.403, p.853–858, 2000.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNEUT, J.J. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *The Journal of Heredity*, Cary, v.90, n.4, p.502–503, 1999.
- RAMOS, A.C.S.; LEMOS FILHO, J.P.; RIBEIRO, R.A.; SANTOS, F.R.; LOVATO, M.B. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. *Annals of Botany*, New York, v.100, p.1219–1228, 2007.
- SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.S. Estimativa de tamanho efetivo de variância por marcadores genéticos. *Revista Árvore*, Viçosa, v.29, n.1, p.1–7, 2005.
- SILVA, D.A. Levantamento do meio físico das estações ecológica e experimental de Itirapina, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Florestal*, São Paulo, v.17, n.1, p.113–128, 2005.
- SILVERTOWN, J. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International Journal of Plant Science*, Chicago, v.169, n.1, p.157–168, 2008.
- STOECKEL, S.; GRANGE, J.; FERNANDEZ-MANJARRES, J.F.; BILGER, I.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; MARIETTE, S. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species – *Prunus avium* L. *Molecular Ecology*, Oxford, v.15, p.2109–2118, 2006.
- TELLES, M.P.C. **Diversidade genética e estrutura populacional de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) do Sudeste de Goiás.** 2000. 129p. Tese (Mestrado) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.
- YOUNG, A.G.; HILL, J.H.; MURRAY, B.G.; PEAKALL, R. Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the sub-alpine forb *Rutidosia leiolepis* F. Muell. (Asteraceae). *Biological Conservation*, Barking, n.106, p.71–78, 2002.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics*, London, v.15, p.322–354, 1951.

Recebido em 30/04/2008
Aceito para publicação em 08/05/2009

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF)

José Maria de Arruda Mendes Filho (Votorantim Celulose e Papel) - Presidente

Armando José Storni Santiago (International Paper do Brasil Ltda.) - Vice-Presidente

Empresas Associadas Mantenedoras / Partners

- » Aracruz Celulose S.A.
- » Arauco Florestal Arapoti S.A.
- » Arborgem Ltda.
- » ArcelorMittal Florestas Ltda
- » ArcelorMittal Jequitinhonha
- » Caxuana S/A Reflorestamento
- » Celulose Nipo-Brasileira S.A. - CENIBRA
- » Consórcio Paulista de Papel e Celulose - Conpacel
- » Copener Florestal / Bahia Pulp
- » Derflin Agropecuária Ltda. (Stora Enso)
- » Duratex S.A.
- » Eucatex S/A Indústria e Comércio
- » International Paper do Brasil Ltda.
- » Jari Celulose S/A
- » Klabin S.A.
- » Lwarcel Celulose e Papel Ltda.
- » Masisa do Brasil Ltda.
- » Nobrecel S.A. Celulose e Papel
- » Ramires Reflorestamentos Ltda.
- » Rigesa Celulose, Papel e Embalagens Ltda.
- » Satipel Florestal
- » Suzano Papel e Celulose S.A.
- » Veracel Celulose S.A.
- » Votorantim Celulose e Papel S/A
- » V&M Florestal