



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica

MICHELE PEREZ VIEGAS

Orientador: Prof Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes

Co-Orientadora: Prof Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração: Sistemas de Produção.

Ilha Solteira – SP
Fevereiro - 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

V656d Viegas, Michele Perez.
Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.,
sob diferentes tipos de perturbação antrópica / Michele Perez Viegas. -- Ilha
Solteira : [s.n.], 2009.
69 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2009

Orientador: Mário Luiz Teixeira de Moraes
Co-orientador: Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva
Bibliografia: p. 59-69

1. Microsatélites. 2. Conservação ex situ. 3. Aroeira do sertão. 4. Marca-
dores genéticos. 5. Fragmentação florestal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica

AUTORA: MICHELE PEREZ VIEGAS

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AGRONOMIA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sôcio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. ALEXANDRE MAGNO SEBBENN
Instituto Florestal de São Paulo - Secretaria do Meio Ambiente / Instituto de Botânica

Profa. Dra. KARINA MARTINS
Curso de Engenharia Florestal / Universidade Federal de São Carlos

Data da realização: 06 de fevereiro de 2009.

Aos meus pais, Francisco Carlos Viegas e Edazina Perez Viegas,

As minhas irmãs, Graciele e Daniele,

Ao meu namorado, Celso,

DEDICO

*Por mais difícil que seja uma situação, não deixe
de acreditar e de lutar até o último momento.*

*“O homem de bem exige tudo de si próprio; o
homem medíocre espera tudo dos outros”*

Confúcio (551-479a.C.)

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pois sem ele nada seria possível.

Ao meu pai, Francisco e minha mãe Edazina, minhas irmãs Graciele e Daniele, pelo apoio incondicional, compreensão, amor, carinho e amizade.

Ao meu namorado Celso, que desde a inscrição para seleção do mestrado, nos momentos mais difíceis e nos mais simples, esteve sempre ao meu lado, apoiando, dando muita força e carinho.

A toda minha família, Vó Jandira e Vó Luci, tias Lúcia, Rê, Bel, Edna, Bá, Marli e até o tio Ademir, e todos os primos e primas, que não são poucos, por todo apoio durante a realização deste trabalho.

* * *

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira e ao Departamento de Fitotecnia Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia pela oportunidade de realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida durante a realização do mestrado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho de dissertação em suas instalações.

Ao Prof. D. Mário Luiz Teixeira de Moraes pela colaboração e orientação a este trabalho.

À Prof. Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva (Kitty), pela orientação, ensinamento, apoio, compreensão e principalmente amizade, em todos os momentos e sem

esquecer o grande carinho por todos os seus orientados, aprendendo a trabalhar com os programas para depois me ensinar, às vezes deixando até sua família um pouco de lado para me ajudar, mostrando um grande profissionalismo.

À pesquisadora Dra. Ana Yamaguishi Ciampi, pela receptividade, amizade, apoio, companheirismo, e muita paciência até mesmo durante as madrugadas quando deixava sua casa para levar eu e Kitty até ao laboratório para colocar as amostras para seqüenciar, isso, durante toda a realização deste trabalho na Embrapa.

À pesquisadora Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo pelo apoio dado durante a realização deste trabalho na Embrapa, perdendo finais de semana e feriados para nos ajudar nos trabalhos de laboratório, auxiliando a resolver os problemas de amplificação e análise dos dados, não deixando de citar o apoio incondicional na escrita deste trabalho.

À banca examinadora da qualificação, ao Prof. Dr. João Antônio da Costa Andrade e ao Prof. Dr. Miguel Luiz Menezes Freitas, pelas valiosas correções e sugestões, contribuindo para melhorar o artigo.

Ao pesquisador e professor Dr. Alexandre Magno Sebbenn, pelas discussões, sugestões e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. Karina Martins por ter sido tão prestativa e pronta a ajudar, contribuindo muito para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação pela atenção, dedicação e compromisso.

* * *

A todos os colegas e amigos que conheci no Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa, principalmente a Patrícia, Douglas, Camila, Natália, Carla e Andréia.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura, Verônica, Bianca, Juzinha, Laila, Juliana, Flavinho e por último, mas não menos importante, aos grandes amigos Deise e Hélio (Guará).

E a todos que mesmo não citados aqui foram muito importantes para a realização deste trabalho.

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Myracrodruon urundeuva* FR.
ALL., SOB DIFERENTES TIPOS DE PERTURBAÇÃO ANTRÓPICA**

Autora: MICHELE PEREZ VIEGAS

Orientador: Prof Dr. MÁRIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES

Co-Orientadora: Prof. Dra. CRISTINA LACERDA SOARES PETRAROLHA SILVA

RESUMO

Os marcadores de microssatélites tem sido utilizados com grande frequência como ferramenta efetiva para estudos de estrutura genética de populações, fluxo gênico, parentesco e para quantificar os efeitos da fragmentação de habitats e guiar estratégias de conservação e melhoramento genético. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética e o sistema reprodutivo em progênies de duas populações de *Myracrodruon urundeuva*, procedentes de Aramina-SP e Selvíria-MS, assim como verificar os efeitos da ação antrópica sobre estas populações. Foram avaliadas 25 progênies de cada população, cada uma com 17 a 20 indivíduos, sendo analisados oito locos polimórficos de regiões microssatélites. Observou-se 118 alelos nas duas populações e o número efetivo por loco ($\hat{A}_e = 4,05$) foi inferior ao número médio de alelos por loco ($\hat{A} = 14,75$), indicando elevado número de alelos em baixa frequência. O índice de fixação ($F = 0,210$ e $0,107$, respectivamente para Aramina e Selvíria) foi positivo, relativamente alto e significativamente diferente de zero. A taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m = 1,000$ e $\hat{t}_m = 1,000$) e unilocos ($\hat{t}_s = 0,989$ e $\hat{t}_s = 0,999$) para as populações de Aramina e Selvíria, respectivamente, foram altos, confirmando que a espécie é obrigatoriamente de cruzamento. A diferença entre a taxa de cruzamento multilocos e unilocos indicam cruzamentos entre indivíduos aparentados na população de Aramina.

Entretanto, as duas populações apresentaram alta diversidade genética, o que as qualifica para utilização em programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: microssatélites, conservação *ex situ*, aroeira, marcadores genéticos, fragmentação.

**GENETIC DIVERSITY IN POPULATIONS OF *Myracrodruon urundeuva* FR. ALI
UNDER DIFFERENT TYPES OF DISTURBANCE ANTROPIC**

Author: MICHELE PEREZ VIEGAS

Adviser: Prof Dr. MÁRIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES

Co-Adviser: Prof. Dra. CRISTINA LACERDA SOARES PETRAROLHA SILVA

ABSTRACT

The microsatellite markers has been often employed as effective tool for studies of genetic structure of populations, gene flow, relationship and also for to quantify environmental fragmentation effects and to outline strategies for conservation and breeding. This study aimed to evaluate the genetic diversity and mating system in progenies of two *Myracrodruon urundeuva* populations from Aramina-SP and Selvíria-MS, as well as verify the effects of antropic action on these populations. From each population were evaluated 25 progenies, with 15-20 individuals each, using genetic data from 8 microsatellite loci. There was 118 alleles in both populations and the actual number per locus ($\hat{A}_e = 4.05$) was lower than the average number of alleles per locus ($\hat{A} = 14.75$), indicating high number of alleles in low frequency. The fixation index ($F = 0,210$ e $0,107$, respectively for Aramina and Selvíria) was positive, relatively high and significantly different from zero. The multilocus outcrossing rate ($\hat{t}_m = 1,000$ e $\hat{t}_m = 1,000$) single-locus ($\hat{t}_s = 0,989$ e $\hat{t}_s = 0,999$) for the populations for Aramina and Selvíria, respectively, they were high, confirming that the species is obligatorily for outcrossing. The difference between the multilocus outcrossing rates and single-locus outcrossing rate indicates mating among relatives in the Aramina population. Meanwhile, the

two populations had high genetic diversity, which qualifies them for use in programs for conservation and breeding of this species.

Key-words: microsatellites, *ex situ* conservation, aroeira, genetic marker, fragmentation.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características dos primers SSR (CAETANO et al., 2005) empregados..... 30
- Tabela 2** - Estimativa de parâmetros genéticos em oito locos microssatélites para 978 indivíduos de duas populações de *Myracrodruon urundeuva*. A é o número de alelos por loco; A_e é o número efetivo de alelos por loco; H_o é a heterozigiosidade observada; H_e é a heterozigiosidade esperada. 45
- Tabela 3** - Estimativa de índices de diversidade genética para duas populações de *Myracrodruon urundeuva*. n é o número de indivíduos analisados; A_t é o número total de alelos; A é o número médio de alelos por loco; A_e é o número efetivo de alelos por loco; A_{excl} é o número de alelos exclusivos; A_r é o número de alelos raros; H_o é a heterozigiosidade observada; H_e é a heterozigiosidade esperada; F é o índice de fixação. 47
- Tabela 4** - Estimativa de diversidade genéticas e estatística G'_{ST} de Hedrick (2005) para o pólen e os óvulos de *Myracrodruon urundeuva*. 48
- Tabela 5** - Estimativa de coeficientes de coancestria (Θ) e tamanho efetivo (N_e) para cada progênie e média populacional para duas populações sob conservação em banco de germoplasma de *Myracrodruon urundeuva*. 50
- Tabela 6** - Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em populações de *Myracrodruon urundeuva*, onde Mat. é o número de matrizes; n é o número de progênies; t_m e t_s são as estimativas da taxa de cruzamento multilocos e unilocos, respectivamente; $t_m - t_s$ é a taxa de cruzamento entre parentes; $r_{p(m)}$ é a correlação de paternidade. 56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - A) Árvore de *M. urundeuva*. B) Ramo com inflorescência. C) Sementes maduras.
..... 20
- Figura 2** - Eletroferograma do padrão de peso molecular, marcado com ROX e empregado em cada amostra para os cálculos de tamanho alélico em pares de bases (pb). O eixo Y indica a intensidade do sinal de fluorescência e o eixo X número da varredura a laser em que se captou o sinal. 31
- Figura 3** - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco A392. 32
- Figura 4** - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco E062. 32
- Figura 5** - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco D094. 33
- Figura 6** - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco C072. 33
- Figura 7** - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco B209. 34
- Figura 8** - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco D282. 34
- Figura 9** - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco D167. 35
- Figura 10** - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco D200. 35
- Figura 11** - Distribuição dos alelos no loco C072, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS. 41

- Figura 12** - Distribuição dos alelos no loco D094, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS..... 41
- Figura 13** - Distribuição dos alelos no loco D167, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS..... 42
- Figura 14** - Distribuição dos alelos no loco E062, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS..... 42
- Figura 15** - Distribuição dos alelos no loco D200, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS..... 42
- Figura 16** - Distribuição dos alelos no loco A392, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS..... 43
- Figura 17** - Distribuição dos alelos no loco B209, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS..... 43
- Figura 18** - Distribuição dos alelos no loco D282, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS..... 43

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1- A espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i>	18
2.2 - Fragmentação e conservação de espécies arbóreas tropicais	20
2.3 - Marcadores moleculares.....	23
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 – Material.....	27
3.2 – Métodos	28
3.2.1 - Amostragem, extração e quantificação do DNA.....	28
3.2.2 - Análises dos locos SSR.....	28
3.2.3 - Análise dos dados.....	36
3.2.3.1 – Diversidade genética e índice de fixação	36
3.2.3.2 - Diferenciação genética entre populações	37
3.2.3.3 - Tamanho efetivo populacional	37
3.2.3.4 – Sistema de Reprodução	39
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 - Diversidade genética	40
4.2 - Diferenciação genética entre populações	47
4.3 - Tamanho efetivo populacional	49
4.4 - Sistema de Reprodução	54
5 – CONCLUSÕES.....	58
6 - REFERÊNCIAS	59

1 - INTRODUÇÃO

A conservação de espécies florestais deve ser conduzida preferencialmente *in situ*, permitindo assim a dinâmica natural das populações ali presentes, e conseqüentemente a sua evolução (FERNANDEZ; MARTINEZ, 2009). Entretanto, quando o ambiente natural teve suas relações ecológicas comprometidas por ações antrópicas, ou por outros fatores, é prudente que também se utilize a conservação *ex situ*, promovendo assim, uma maior garantia da sobrevivência das populações (PINTO et al., 2004, SEGARRA-MORAGUE'S et al. 2005).

Perturbações antrópicas têm levado a fragmentação de populações naturais de espécies florestais, gerando um risco real de erosão genética e até mesmo de extinção de espécies, especialmente nos biomas tropicais (PINTO et al., 2004). Quando a floresta se torna fragmentada há uma diminuição no tamanho das populações, e conseqüentemente na sua diversidade genética do potencial evolutivo das populações arbóreas ali presentes tornando-as isoladas e vulneráveis a eventos ambientais, demográficos e genéticos, causando reduções. A diversidade genética é fundamental para a sustentabilidade das espécies, pois fornece matéria-prima para a adaptação, evolução e sobrevivência populações arbóreas (RAJORA; MOSSELLER, 2001), entretanto a ocorrência de perturbação antrópica pode levar à alteração da distribuição da variabilidade genética gerando estruturação genética espacial nas (LACERDA ; KAGEYAMA, 2003, MORAES et al., 2005).

A exploração inadequada de populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., vem comprometendo sua capacidade de sobrevivência em habitat natural (FREITAS et al., 2006), dessa forma ações que promovam a sua conservação *ex situ* são importantes.

Esta é uma espécie arbórea tropical dióica (SANTOS, 1987), polinizada por insetos e encontrada na Argentina, Brasil, Bolívia e Paraguai. No Brasil, a espécie naturalmente se distribuía desde o estado do Ceará até o estado do Paraná, entretanto, atualmente grande parte

desta área de ocorrência encontra-se fragmentada. Como conseqüência, *M. urundeuva* atualmente é pouco encontrada na região centro-sul do Brasil, especialmente no estado de São Paulo, onde não mais se apresenta em grandes proporções em seu estado silvestre, exceto em reservas estaduais e reservas particulares. Nestas, com freqüência observa-se que a distribuição é do tipo agrupado, em forma de manchas, constituído por menos de cem indivíduos. As manchas são provavelmente resultantes da dispersão das sementes próximas às árvores matrizes, o que gera estruturação genética espacial intrapopulacional (MORAES et al., 2005).

Se estas populações forem mantidas pequenas por muitas gerações poderão perder variabilidade genética por deriva genética, o que leva a endogamia e desencadeia a depressão endogâmica. Conseqüentemente, haverá reduções na capacidade adaptativa, no vigor, no porte e produtividade, entre outros fatores (RITLAND, 1996). Portanto, esta é uma espécie que necessita de conservação, e para que sejam traçadas estratégias adequadas, deve-se dar ênfase a estudos sobre a biologia reprodutiva, métodos de propagação, estrutura genética, tamanho efetivo populacional e variação genética entre e dentro das populações (RESENDE, 1999, KAGEYAMA et al., 2003, SEBBENN, 2003).

Estudos prévios avaliaram a diversidade e estrutura genética de outras populações de *M. urundeuva* utilizando marcadores isoenzimáticos (MORAES et al., 2005), RAPD e cpDNA (REIS et al., 2004), AFLP (FREITAS et al., 2005) e microssatélites (CAETANO et al., 2008).

O objetivo geral deste estudo foi criar um banco de dados de parâmetros genéticos que propiciem informações para que estratégias de conservação e melhoramento genético de populações de *Myracrodruon urundeuva* sob diferentes tipos de perturbação antrópica, possam ser estabelecidas.

Assim, tem-se por objetivos específicos, com base na estimativa de parâmetros genéticos, obtidos em análises moleculares de locos microssatélites (SSR):

- i) Avaliar a diversidade genética em progênies de duas populações de *M. urundeuva* procedentes de Aramina-SP e Selvíria-MS.
- ii) Estudar o sistema de reprodução apresentado por *M. urundeuva* nestas populações.
- iii) Verificar os efeitos da ação antrópica como o cultivo da cana-de-açúcar em Aramina-SP e da pecuária extensiva em Selvíria-MS, nas populações de *M. urundeuva*.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A espécie *Myracrodruon urundeuva*

O termo aroeira pode ser encontrado em quatro gêneros da família Anacardiaceae: *Lithraea*, *Schinus*, *Astronium* e *Myracrodruon*. A aroeira-preta é a *Myracrodruon urundeuva* Allemão, que possui os sinônimos *Astronium juglandifolium* Griseb. e *Astronium urundeuva* Engl., é uma planta dióica e alógama (SANTOS, 1987, MORAES; FREITAS, 1997). Nas florestas primárias, *M. urundeuva* pode estar associada a outras espécies, ao contrário do que se observa nas florestas secundárias, onde sua ocorrência é praticamente homogênea, especialmente em áreas perturbadas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION-FAO, 1986). Atualmente, *M. urundeuva* é pouco encontrada na região centro-sul do Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, onde não é mais possível encontrá-la em grandes proporções em seu estado silvestre, a não ser em reservas estaduais e pequenas reservas particulares. Nestas, com frequência observa-se que a distribuição é do tipo agrupado, em forma de manchas, constituído por menos de cem indivíduos. As manchas podem ser constituídas pela dispersão das sementes próximas às árvores matriz, o que favorece a estruturação genética das populações (MORAES et al., 2005).

Os principais vetores de polinização de *M. urundeuva* são abelhas e diversos pequenos insetos, o que resulta em interesse para a apicultura. A floração é ampla e variada, ocorrendo em diferentes meses do ano, dependendo da localização das populações: em janeiro, ocorre no Pernambuco; de março a abril, no Ceará; de maio a julho, em Minas Gerais; de julho a agosto, no Estado de São Paulo e no Distrito Federal; de agosto a setembro, Mato Grosso do Sul, e em outubro, no Rio Grande do Norte (CARVALHO, 1994). Moraes (1992) relata que

em um reflorestamento homogêneo com *M. urundeuva* o primeiro evento de florescimento ocorreu aos três anos e meio de idade, sendo observado em 34,7% das plantas.

As sementes de *M. urundeuva* são esféricas, castanho-amareladas, aladas, a dispersão é do tipo anemocórica, de maturação rápida e muito pequena, o que dificulta a coleta. A semente apresenta pequena dormência atribuída ao embrião, perdendo poder germinativo em pouco tempo, em condições naturais, devido à impermeabilidade do tegumento. Testes feitos com as sementes armazenadas à temperatura ambiente por mais de um ano comprovaram que elas após esse período, não mais germinavam (GONZAGA et al., 2003). A crioconservação dessas sementes é um método de armazenamento promissor para *M. urundeuva* (CARVALHO, 1994).

Estudos realizados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) indicam que um pedaço de madeira de *M. urundeuva* do tamanho de uma caixa de fósforos suporta 6 toneladas de carga, sem se deformar. A característica de durabilidade é encontrada em apenas 1% a 5% das madeiras e apenas menos de 1% delas são muito duráveis. De acordo com testes realizados pelo IPT, *M. urundeuva* foi classificada como muito durável e está incluída no grupo das madeiras chamadas imputrescíveis (MAINIERI; CHIMELO, 1989, BRAGA, 1990).

Além das propriedades mecânicas que formam uma barreira física de proteção, existe também uma barreira química caracterizada por uma elevada quantidade de compostos fenólicos em função de sua riqueza em metabólitos secundários, que podem ou não estar associado à lignina, sendo provavelmente, os principais responsáveis pela resistência natural da espécie à degradação química e biológica (QUEIROZ et.al., 2002). Tais características tornam esta madeira muito adequada à confecção de postes, esteios, moirões, dormentes, etc.

Devido as suas qualidades, a procura pela madeira levou à redução do tamanho das populações naturais e, em muitos casos, dizimando-as totalmente. Novas perspectivas quanto

a sua utilização vêm sendo realizadas, como a sua utilização medicinal (FREITAS et al., 2005).

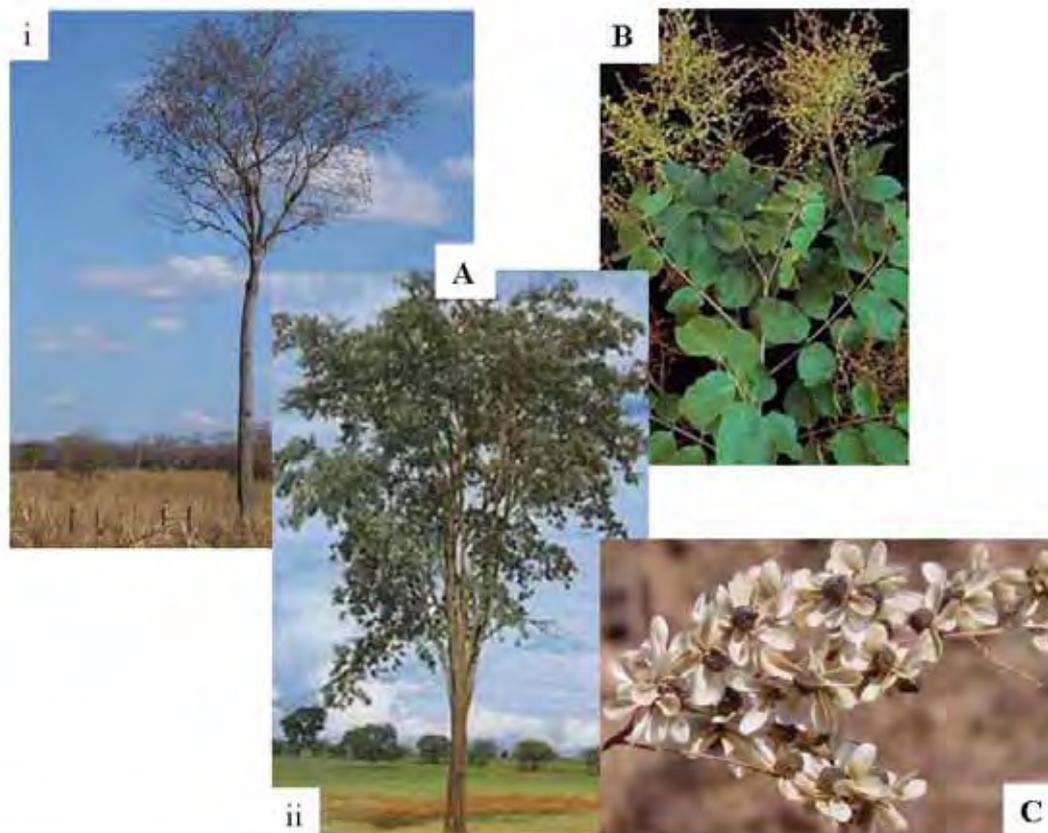


Figura 1 - A) Árvore de *M. urundeuva*. B) Ramo com inflorescência. C) Sementes maduras. (Fontes: Fotos Ai e C – WWW.biologo.com.br/plantas/cerrado, Fotos Aii e B – Lorenzi, 1992.)

2.2 - Fragmentação e conservação de espécies arbóreas tropicais

Os efeitos da degradação dos diversos ecossistemas vêm sendo objeto de discussões e estudos nos últimos anos, tanto por parte de instituições governamentais quanto pela comunidade científica (RAJORA et al., 2000). Neste sentido, atitudes vêm sendo tomadas com o objetivo de quantificar esse impacto e definir estratégias de conservação adequadas para ecossistemas em intensa fragmentação (AZEVEDO, 2007).

As florestas brasileiras vêm sofrendo acelerado processo de fragmentação, principalmente em decorrência da expansão urbana e das atividades ligadas ao crescimento populacional. Dessa maneira, a fragmentação é um processo resultante da ação antrópica, que possui dois componentes principais: a redução da área de um habitat grande e contínuo, e a divisão do habitat remanescente em fragmentos menores (ISHIHATA, 1999).

A fragmentação florestal provoca a diminuição do número de indivíduos de uma população, favorecendo a perda de variação genética. A população remanescente passa a ter um tamanho menor que o mínimo adequado (N_e mínimo) para que o mesmo possa ter sua normal continuidade e evolução. Nessa população pequena pode ocorrer, em curto prazo, deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos. Em longo prazo, ainda pode haver um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e cruzamentos entre indivíduos remanescentes (KAGEYAMA, et al., 1998).

Somado a isto há ainda uma perda de genes adaptados aos ambientes específicos de ocorrência das espécies arbóreas. A redução contínua no tamanho das populações as submete a diminuição da variabilidade genética, por deriva genética (SEBBENN; ETTORI, 2001), podendo causar a depressão por endogamia e conseqüentemente, reduzir a capacidade de sobrevivência além da capacidade adaptativa, a fertilidade, o vigor, o porte e a produtividade, entre outros (ALLARD, 1971, RITLAND, 1996).

Atualmente existe grande preocupação a respeito das conseqüências da pressão antrópica sobre a dinâmica de florestas tropicais e de seus ecossistemas. Considerando-se o alto nível de diversidade biológica encontrada nestas florestas, constitui-se em um grande desafio o conhecimento de sua estrutura, levando-se em conta a organização das comunidades, a dinâmica das populações, os eventos de especiações e as variações

fisiológicas que atribuem características demográficas e comportamentais que sustentam toda sua complexidade (BAZZAZ, 1991).

Processos demográficos (como natalidade, mortalidade, dispersão de sementes e recrutamento) e taxas de crescimento são dois atributos funcionais que podem ser considerados importantes componentes da biodiversidade de espécies que sofrem com a exploração. No entanto o fator genético é o componente mais sensível ao desmatamento (PUTZ et al., 2000), e é componente chave da sustentabilidade dos recursos florestais (RAJORA et al., 2000). Conhecer a distribuição da variação genética dentro e entre populações pode promover descobertas relativas à história de uma população, uma vez que os atuais níveis e a distribuição da variação genética podem influenciar o sucesso futuro de populações (ERICKSON et al., 2004).

Assim, o conhecimento da estrutura genética de populações é entendido como a etapa fundamental para a realização de programas conservacionistas. Os dados gerados por pesquisas em genética de populações podem ser utilizados para definir unidades de conservação e prioridades para o manejo de recursos genéticos, indicando áreas e populações de maior ou menor importância para a preservação de táxons em questão e permitindo o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação (CAVALLARI, 2004).

O melhoramento de espécies nativas é de grande importância pois muitas espécies arbóreas tropicais não apresentam comportamento de sociabilidade, ou seja, dentro da mesma espécie existe um mecanismo que faz com que não seja possível o plantio homogêneo da espécie *ex situ*, não se adequando a plantios puros. Assim, a conservação genética dessas espécies demanda maior interesse do que o próprio melhoramento genético. Portanto, deve-se dar ênfase a estudos sobre a biologia reprodutiva, os métodos de propagação dessas espécies, o conhecimento da estrutura genética, do tamanho efetivo populacional e da variação genética

entre e dentro das populações (KAGEYAMA et al., 1990, RESENDE, 1999, SEBBENN, 2003).

A obtenção de populações melhoradas, que satisfaçam às exigências da produtividade florestal, depende da capacidade de identificação de genótipos desejados na população sob seleção. Uma estratégia de eficiência comprovada para a seleção desses genótipos é a combinação dos testes de procedências e progênies, que permitem a determinação do valor reprodutivo dos indivíduos selecionados, a estimativa de parâmetros genéticos, da estrutura genética e seleção, orientando decisões práticas no programa de melhoramento (KEIDING, 1976, SAMPAIO et al., 2000, AGUIAR, 2004). Dessa forma, os testes de progênies, além de serem extremamente úteis para a conservação genética, permitem o contínuo potencial evolutivo das espécies e o resgate de material genético para o uso em futuros programas de melhoramento (ETTORI et al., 1999).

2.3 - Marcadores moleculares

Quando se objetiva a efetiva conservação genética de uma espécie, utiliza-se o conhecimento prévio de seu sistema de reprodução, estrutura e diversidade genética, no delineamento de estratégias para a recombinação, amostragem e uso do material genético remanescente. Tais informações podem ser obtidas por meio do uso de marcadores genéticos, e no caso de espécies arbóreas, programas de conservação têm procurado dar ênfase à determinação dos níveis de variabilidade genética mantidos dentro e entre populações naturais, como forma de planejar o uso sustentável e a conservação *in situ* (KAGEYAMA, 1987).

O uso da biologia molecular vem sendo determinante em estudos sobre a variabilidade genética das populações e na estimativa da diferenciação genética existente

entre as espécies. Isto se deve principalmente aos avanços significativos na área de marcadores moleculares aliados a PCR (reação em cadeia da polimerase), que vem possibilitando a amplificação dos conhecimentos sobre espécies nativas. Marcadores microsatélites ou SSRs tem sido utilizado nos estudos de populações naturais (COLLEVATTI et al., 2001, DICK et al., 2003, MARTINS et al., 2006, AZEVEDO et al., 2008) uma vez que são altamente polimórficos quando comparados com outras classes de marcadores, podendo responder a diversas questões sobre a genética de populações como estrutura genética espacial, sistema de cruzamentos e fluxo gênico.

Os microsatélites são abundantes e estão dispersos nos genomas eucariotos, em regiões codificadoras e não codificadoras; possuem herança codominante, o que discrimina homozigotos de heterozigotos; são multialélicos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco entre todas as classes de marcadores moleculares e são detectáveis por meio de PCR; altamente reproduzíveis; não requerem radioatividade; os locos são frequentemente conservados entre espécies relacionadas, podendo ser transferidos e uma vez desenvolvidos podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios. Todas essas características tornam a utilização deste marcador vantajosa, fazendo com que este possa ser considerado um marcador ideal. Os SSRs são ainda automatizáveis em sistemas *multiplex*, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos a curto prazo (AZEVEDO, 2007).

A variabilidade genética é a base da biodiversidade e pode ser acessada por meio de marcadores genéticos. Em estudos populacionais de espécies arbóreas, a utilização de marcadores genéticos baseados em PCR tem demonstrado tratar-se de ferramenta altamente eficiente. Em *Myracrodruon urundeuva* os primeiros estudos com marcadores genéticos envolveram a utilização de isoenzimas e posteriormente a utilização de marcadores via PCR do tipo RAPD, análise de seqüências de cpDNA, marcadores AFLP e mais recentemente

marcadores microssatélites (MORAES, 1992, LACERDA et al., 1999, REIS, 1999, LACERDA et al., 2003, REIS; GRATTAPAGLIA, 2004, CAETANO et al., 2005, FREITAS et al., 2005, CAETANO et al., 2008).

A associação de técnicas moleculares às técnicas tradicionais de melhoramento pode propiciar um grande avanço na obtenção de genótipos superiores. Assim os marcadores moleculares funcionam como ferramentas auxiliares no melhoramento genético florestal, permitindo entre outros, avaliações da adequação da base genética de populações florestais para utilização em programas de melhoramento (CAIXETA, 2003), avaliações da ocorrência de genes ligados a características específicas, e ainda propiciam uma redução do tempo de seleção dos materiais genéticos a partir da seleção assistida e estudo de características poligênicas pela detecção de QTLs (ENGELBORHS et al., 1998).

Métodos tradicionais, como os testes de procedências, associados aos marcadores moleculares vêm sendo empregados no estudo da diversidade genética em populações de espécies florestais. O conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações destas espécies, é essencial para adoção de estratégias eficientes que visam a conservação de germoplasma *ex situ* e *in situ* (OLIVEIRA et al., 2006)

Empregando-se marcadores genéticos do tipo fAFLP, Freitas et al. (2005) analisaram a divergência genética e distância entre progênies de *Myracrodruon urundeuva* oriundas de uma população de Paulo de Faria - SP. Foram detectados altos níveis de divergência genética entre progênies, sendo que 16,2% da variabilidade genética encontravam-se entre progênies e 83,8%, dentro de progênies, indicando desvios de cruzamentos aleatórios. O agrupamento das progênies, a partir das distâncias genéticas, sugere que progênies derivadas de árvores próximas tendem a ser mais similares entre si. Isto mostra a possibilidade de estruturação genética na população (FREITAS et al., 2005).

Marcadores de RAPD foram usados para estudar a distribuição e a variabilidade genética em uma coleção de germoplasma de *M. urundeuva* com polinização aberta, com árvores dispostas 300m umas das outras, agrupando-se em nove áreas de coleção ao longo do Brasil, incluindo também duas populações naturais. Em análises com 83 marcadores de RAPD, baseado em semelhanças genéticas não houve nenhum agrupamento definido entre indivíduos das mesmas áreas de coleção. Com isso observou-se 92% de variação genética dentro de áreas de coleção. Nos indivíduos das duas populações naturais observou-se 97% de variabilidade dentro das populações. Estes resultados indicam que para o estabelecimento de reservas genéticas *ex situ* ou para a conservação *ex situ*, deve-se manter a conservação de várias árvores individuais ou coleção de sementes obtidas de polinização aberta de locais distantes (REIS; GRATTAPAGLIA, 2004).

Apesar de todas as vantagens descritas em se utilizar seqüências SSR, cuidados devem ser tomados ao se utilizar esses locos em estudos de genética de populações envolvendo evolução e conservação (AZEVEDO, 2007). De acordo com Hedrick (1999) a interpretação da significância dos resultados em estudos com estes marcadores deve ser feita com cautela, pois as estimativas de distância e diferenciação genética são influenciadas pelo nível de heterozigosidade, que no caso dos SSRs não correspondem à verdade uma vez que são regiões hiper-variáveis.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

Foram estudadas progênies de duas populações de *Myracrodruon urundeuva*, submetidas à perturbação, mais recentemente, pela expansão de fronteiras antrópicas pelo emprego da pecuária extensiva e pelo plantio da cana-de-açúcar. A primeira população localiza-se em fragmentos florestais entremeados com áreas de intenso plantio de cana-de-açúcar, onde o solo não foi propício para o cultivo da monocultura, na região de Aramina-SP (20° 03'S e 47° 48'W; altitude média 605m). Esta população vem sofrendo com a antropização desde o século XIX, com a degradação da região para o cultivo das culturas de café e algodão e atualmente com a cultura da cana-de-açúcar que é à base da economia de Aramina. A segunda população encontra-se na região de Selvíria-MS (20° 19'S e 51° 26'W; altitude média 372m), dentro da área de exploração da pecuária extensiva. Nesta área a degradação do local foi mais lenta, pois sempre que havia necessidade de expansão da área de pasto, uma parte da reserva florestal era degradada, tomando o cuidado de manter algumas árvores no meio do pasto para que o gado fizesse uso de sua sombra. Uma população dista da outra cerca de 460 km. Em cada uma destas populações, foram eleitas 25 árvores matrizes, das quais foram coletadas sementes para instalação de testes de progênies, em 26 de fevereiro de 1992, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão – FEPE - da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), localizada no município de Selvíria – MS.

3.2 – Métodos

3.2.1 - Amostragem, extração e quantificação do DNA

A amostra populacional para os estudos genéticos constituiu-se de 25 progênies de cada população, cada uma com 17 a 20 indivíduos, num total de 978. Os tecidos vegetais utilizados para a extração do DNA foram folhas jovens, sendo coletadas, identificadas e acondicionadas em sacos de papel, contendo sílica gel azul (8mm) até o momento da extração do DNA, mantendo assim a integridade do DNA.

A extração do DNA genômico foi realizada no Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura (LGPS da FEIS/UNESP), empregando-se o protocolo Doyle e Doyle (1990), com modificações realizadas por Silva et al. (2008b), com a adição de proteinase K (100 ug/mL), de PVP-40 (4%), PVP-360 (1%), β mercaptoetanol (2%) na solução de extração. A quantificação e verificação da qualidade do DNA genômico foi feita em comparação com DNA padrão (λ DNA) em gel de agarose 0,8%, com TEB 1X (Tris 28 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 7 mM, pH 8,3) corado com brometo de etídio (5 μ g/ mL). O DNA foi diluído para 1,0ng/ μ l.

3.2.2 - Análises dos locos SSR

As análises dos locos SSR foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal do Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN/EMBRAPA. Para otimização de temperatura e pareamento dos *primers* SSRs foram utilizadas cinco amostras de DNA escolhidas aleatoriamente e empregadas em reações PCR-SSR, com o intuito identificar-se a temperatura ideal de pareamento dos *primers* SSR. Nesse teste empregou-se inicialmente as

condições de amplificação proposta por Caetano et al. (2005). Para amplificação dos alelos utilizou-se termocicladores 9600 e 9700 Applied Biosystem, com blocos para placas de 96 poços, com o seguinte programa: um ciclo de 94°C por 3 min., 35 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de pareamento por 30 s, 72°C por 30 s, e um ciclo final de 72°C por 5 min. Para cada *primer*, foram testadas de 12 a 17 temperaturas de pareamento, a saber: 36°C, 36,2°C, 37,3°C, 39,1°C, 41,3°C, 43,9°C, 46,7°C, 49,4°C, 52°C, 54°C, 55,8°C, 56,7°C, 58,5°C, 61°C, 63,1°C, 64,7°C e 65,6°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, em TEB 1X, com ddp constante de 60V por cerca de três horas. As temperaturas que produziram bandas robustas e sem ocorrência de artefatos foram escolhidas para as amplificações posteriores.

A amplificação dos locos SSR foi realizada a partir de uma reação geral descrita a seguir: 6 μ L de reação contendo 1ng DNA genômico, 2,5mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, Taq DNA polimerase (Go Taq Master Mix PROMEGA), 0,33 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e água ultrapura estéril. O componente *Foward* de cada par de *primers* foi marcado na sua extremidade 5' com um fluorocromo conforme descrito na Tabela 1. As condições de termociclagem foram as mesmas acima descrita, exceto para o *primer* D282, cujo o programa de amplificação foi do tipo *touchdown* (um ciclo de 95°C por 5 min, cinco ciclos de 95°C por 45 seg, 68°C por 5 min (-2°C/ciclo), 72°C por 1 min, cinco ciclos de 95°C por 45 s, 58°C por 2 min (-2°C/ciclo), 72°C por 1 min, 25 ciclos de 95°C por 45 s, 50°C por 2 min (-2°C/ciclo), 72°C por 1 min, e finalmente um ciclo de 72°C por 5 min.

Tabela 1 - Características dos primers SSR (CAETANO et al., 2005) empregados.

Primer - SSR	Seqüência 5' – 3'	T _{pareamento} (°C)	Marcação com fluorocromo
Auru D200 – F	TTCACCACAGGTTTGCG	55,8	NED
Auru D200 - R	TAGTGAGCAACGACGAGAGC		-----
Auru E062 – F	CAAAATTGCCGTCTGGGC	49,4	NED
Auru E062 - R	GGATCGGATTCAGCGGG		-----
Auru B209– F	CACATTAACTCCTAATTACAAGG	49,4	HEX
Auru B209- R	AAGCATGTGTATGACAGCTC		-----
Auru A392– F	GCAAGAAATAAAAGAATCAGATG	43,9	NED
Auru A392- R	GTGTAACAGCCCACAGTATCAG		-----
Auru C072– F	ATGCATCTAGCTTGCTCTTTC	61	FAM
Auru C072- R	TTAACTGTCGGGGGTTTCG		-----
Auru D167– F	TGTTGTTACGAGAGAAGGCAG	58,5	NED
Auru D167- R	TACCCTACGTGTTATCCATCTG		-----
Auru D282– F	TTCAAAGTGGTGTCAATTAAGC	TD* 65-55	FAM
Auru D282- R	CATTTGACCATAGACAAGAGC		-----
Auru D094– F	CACATTTGAAAAATGCTAGGG	61	HEX
Auru D094- R	ATGGTGATGGGGAAACTCTC		-----

• TD: Amplificação tipo *touchdown*

As reações de PCR foram realizadas separadamente para cada loco. O produto destas reações foi diluído (1 µL de reação para 5 µL de água ultrapura estéril), para montagem de multiplex com 2 ou 3 amplificadores de locos distintos, sendo 1 µL de cada amplificado, 9 µL de formamida Hi Di, 0,65 µL de água ultrapura estéril e 0,35 µL do marcador interno fluorescente (ROX). O marcador interno fluorescente (Figura 2) utilizado nestas reações foi desenvolvido por Brondani e Grattapaglia (2001). Os multiplex foram desnaturados a 94°C por 5 minutos, e em seguida analisados por eletroforese capilar para detecção dos alelos por fluorescência, em analisador automático de fragmentos ABI Prism 3700 (Applied Biosystem).

A detecção e a estimativa do tamanho de alelos em pares de bases foram realizadas com o uso do *software ABI Prism GeneScan* versão 3.7 (Applied Biosystems). Logo, os valores foram importados para o *software ABI Prism Genotyper* versão 2.0 NT (Applied Biosystems) (Figuras 3 a 10) para filtragem dos picos e interpretação dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo. Os valores alélicos, foram ajustados em categorias discretas, com base em quadrados mínimos pelo *software AlleloBin* (IDURY; CARDON, 1997) eliminando o problema de padronização com uso de critérios pessoais.

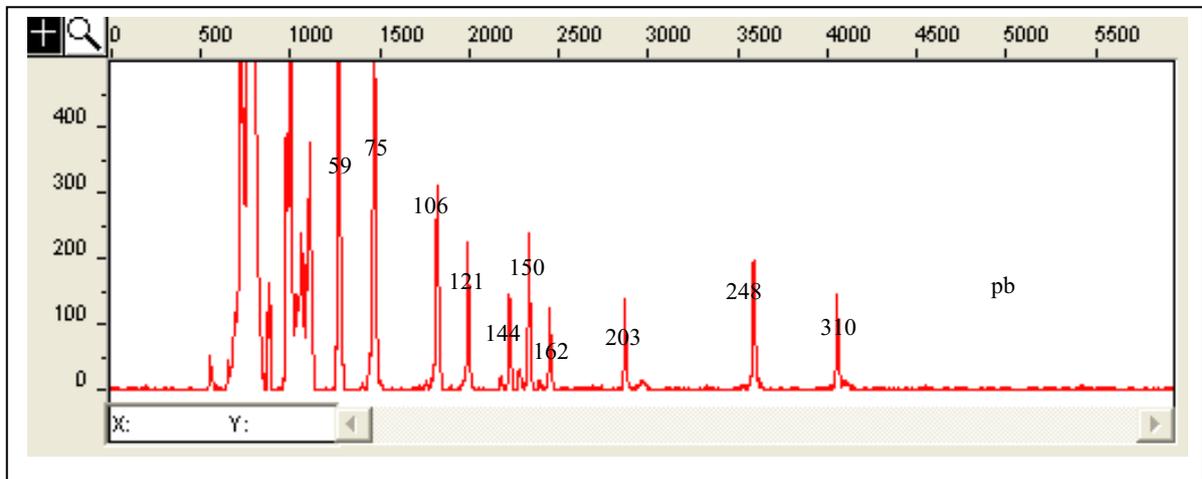


Figura 2 - Eletroferograma do padrão de peso molecular, marcado com ROX e empregado em cada amostra para os cálculos de tamanho alélico em pares de bases (pb). O eixo Y indica a intensidade do sinal de fluorescência e o eixo X número da varredura a laser em que se captou o sinal.

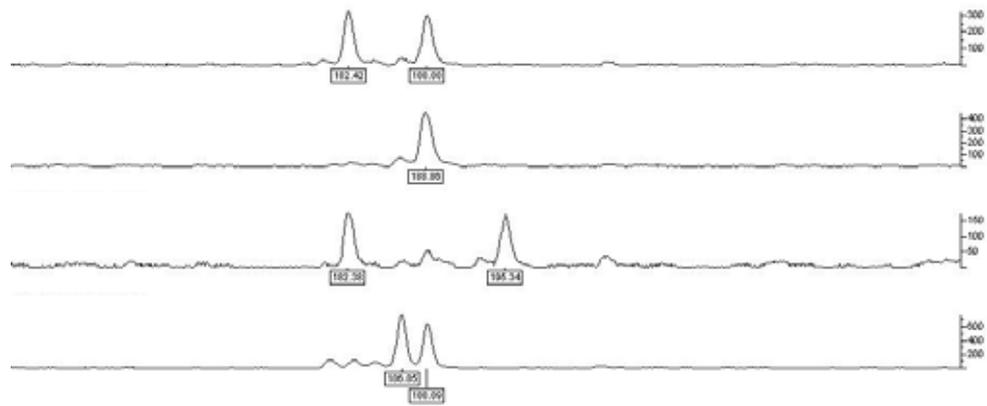


Figura 3 - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco A392.

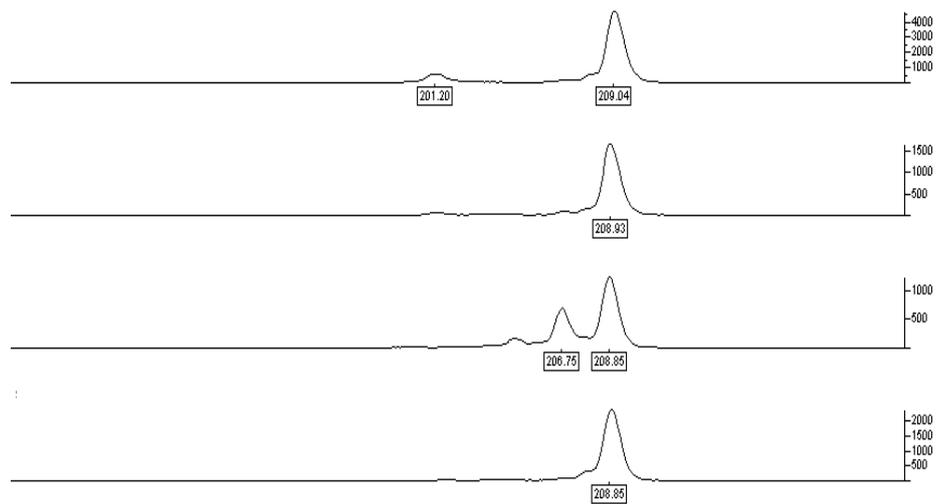


Figura 4 - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco E062.

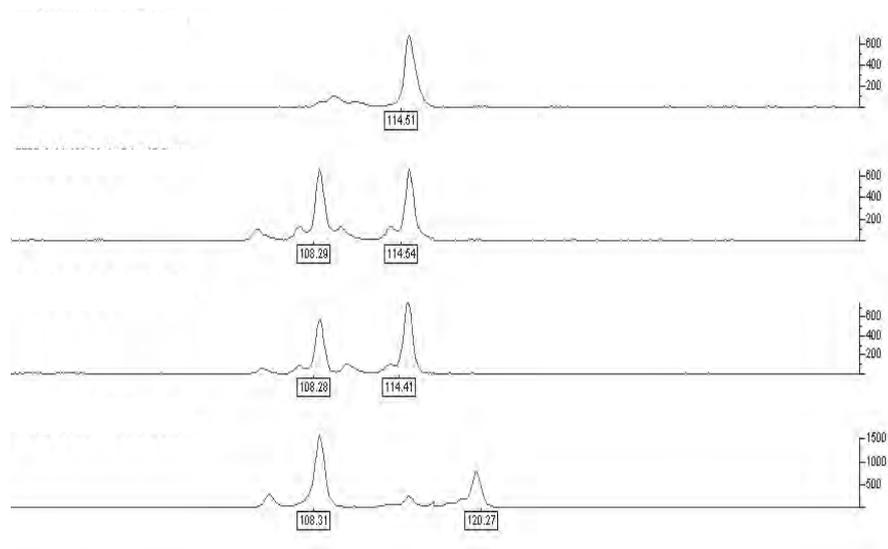


Figura 5 - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco D094.

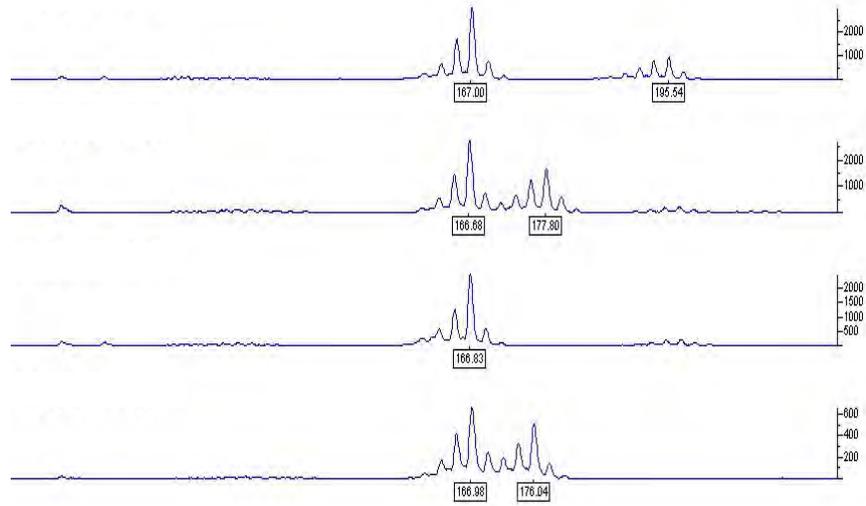


Figura 6 - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco C072.

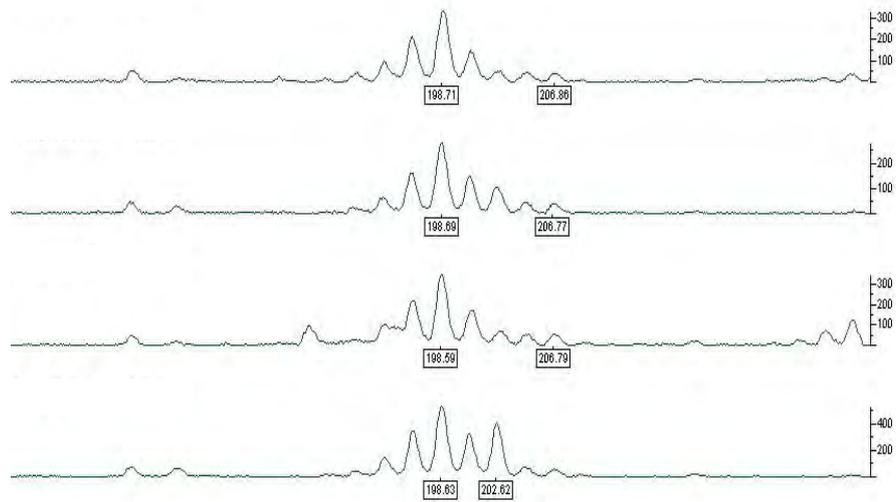


Figura 7 - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco B209.

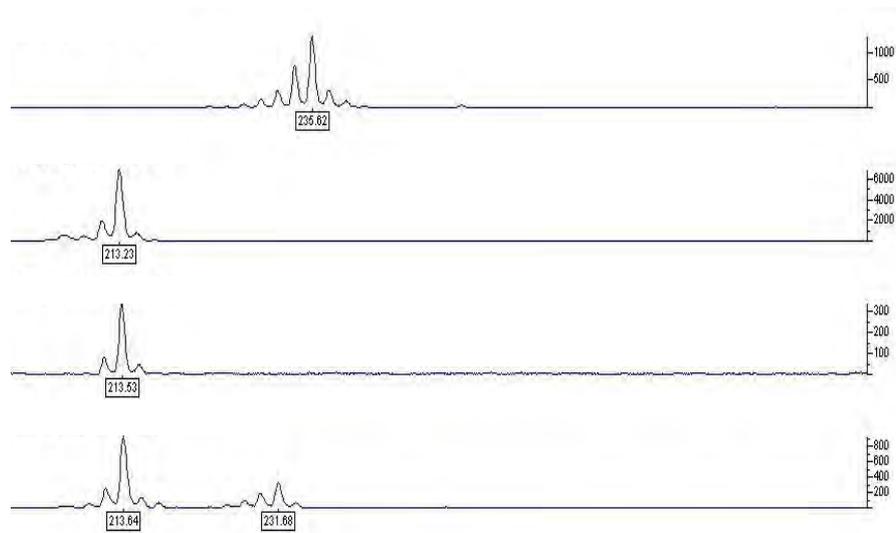


Figura 8 - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco D282.

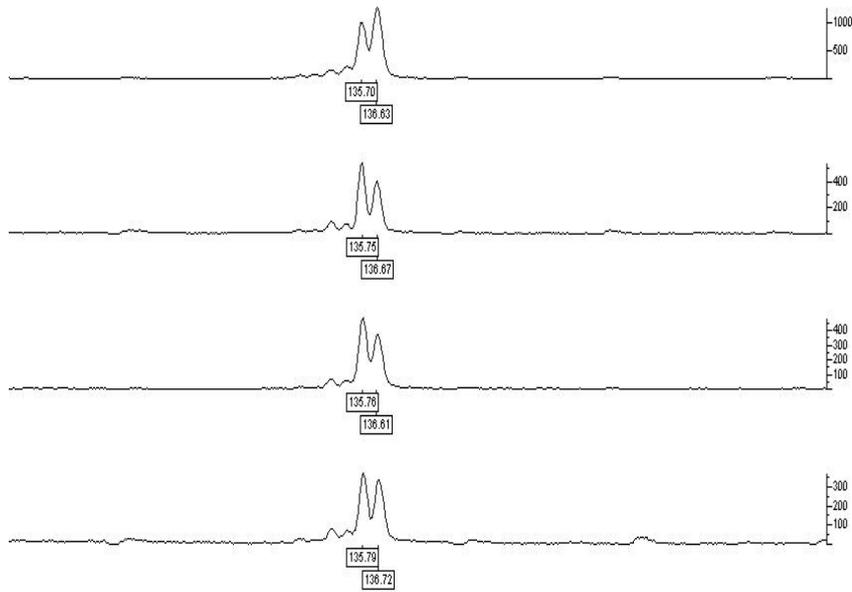


Figura 9 - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco D167.

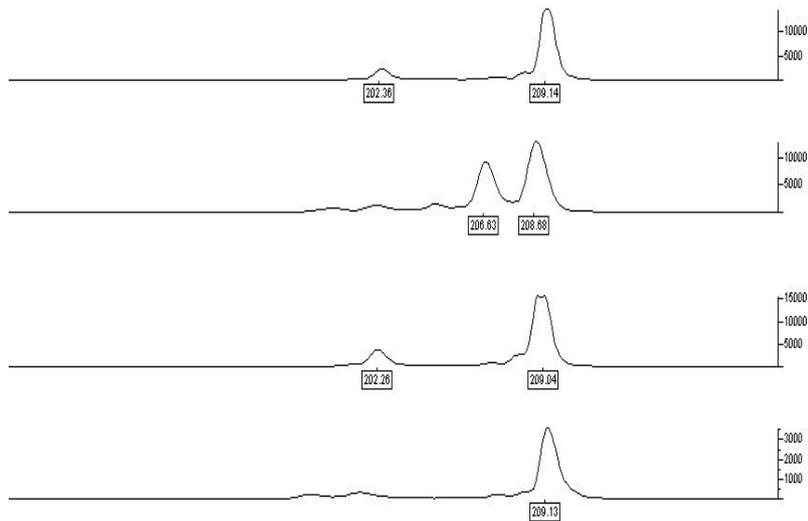


Figura 10 - Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *M. urundeuva* no loco D200.

3.2.3 - Análise dos dados

3.2.3.1 – Diversidade genética e índice de fixação

A diversidade genética em cada população foi estimada agrupando todas as progênies. O número total de alelos (A_t), número médio de alelos (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados para locos e média entre locos. Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação médio entre progênies (F) de acordo com o método de Weir e Cockerham (1984). A significância estatística dos valores de F foram testados por permutação (10.000), utilizando uma correção para *Bonferroni* (95%, $\alpha=0,05$). O erro padrão dos valores de F foram estimados por reamostragem *Jackknife* sobre os locos. Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados pelos valores índice de fixação em cada população e utilizando um teste exato de Fisher e 10000 permutações. Aplicou-se uma correção de *Bonferroni* (95%, $\alpha=0,05$) para evitar falsos positivos. Todas estas análises foram geradas utilizando os programas FSTAT, versão 2.9.3.2. (GOUDET et al., 2002) e GDA, versão 1.1 (Lewis e Zaikin, 2002). Adicionalmente, estimou-se o número efetivo de alelos por loco (A_e) usando a expressão $A_e = 1/(1 - H_e)$. Os alelos foram classificados em dois grupos de acordo com suas frequências nas populações: a) alelos privados (ocorrentes em apenas umas das populações) e; b) alelos raros ($p \leq 0.05$). As frequências gênicas foram estimadas utilizando-se o programa FSTAT.

3.2.3.2 - Diferenciação genética entre populações

Como a amostra utilizada estava estruturada em famílias de polinização aberta, a diferenciação genética entre as populações foi investigada utilizando-se as frequências gênicas estimadas separadamente para óvulos e polens. A estimativa da diferenciação genética entre populações usando estrutura de progênies não é adequada, visto que cada planta de uma progênie sempre recebe um dos alelos da árvore materna, o que superestima a frequência destes alelos. As frequências alélicas medidas no pólen, podem melhor representar as frequências alélicas da população, devido ao fato de que cada progênie pode receber pólen de um diferente pai. Isso só não será verdadeiro, caso os cruzamentos sejam biparentais, ou seja, as progênies sejam formadas por irmãos-completos. As frequências alélicas foram estimadas separadamente para o pólen e os óvulos usando o programa MLTR (RITLAND, 2002). Para medir a diferenciação genética entre as populações, foi empregado o método desenvolvido para locos microssatélites por Hedrick (2005), e a estatística G'_{ST} . A significância estatística dos valores G'_{ST} foram testados utilizando-se o método de Jackknife entre os locos.

3.2.3.3 - Tamanho efetivo populacional

O tamanho efetivo foi calculado individualmente para cada progênie e para o conjunto das progênies de cada população (estimativa populacional), usando a expressão:

$$\hat{N}_e = 0.5/\Theta \text{ (COCKERHAM, 1969),}$$

em que, Θ é o grupo de coancestria (dentro de progênies e para a população total). O coeficiente de coancestria foi calculado entre plantas de mesma e de diferentes progênies utilizando o estimador proposto por J. Nason, e descrito em Loiselle et al. (1995) e o programa

SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS 2002). Para esta estimativa, utilizou-se as frequências alélicas medidas no pólen como sendo representativas das frequências alélicas da população parental. O coeficiente de coancestria esperado dentro de progênies de polinização aberta de espécies dióicas, na ausência de cruzamento entre parentes é de 0.125 para indivíduos meios-irmãos e de 0.25 para indivíduos irmãos-completos. O coeficiente de coancestria de grupo dentro de progênies foi estimado por:

$$\hat{\Theta}_{xy} = \frac{\sum_{x=1}^{n_f} \sum_{y \neq 1}^{n_f} \hat{\theta}_{xy}}{n^2 - n},$$

onde, n é o número de progênies dentro de cada família, θ_{xy} é o coeficiente de coancestria entre os irmãos x e y dentro de cada família. O coeficiente de coancestria é uma medida de identidade por descendência dos alelos entre indivíduos. Neste caso, como a referência é uma simples progênie, esta identidade pode se obter de duas formas: a) devido apenas aos alelos maternos, no caso de dois meios-irmãos maternos (cruzamento da árvore matriz com dois indivíduos diferentes e não parentes e; b) devido a ambos alelos maternos e paternos, no caso de dois irmãos-completos (cruzamento da árvore matriz com o mesmo pai duas vezes). O coeficiente de coancestria de grupo estimador em nível populacional foi calculado por:

$$\hat{\Theta} = \frac{\sum_{x=1}^{n_f} \sum_{y \neq 1}^{n_f} \hat{\theta}_{xy} + 2n_{hs}\theta_{hs}}{\sum_{i=1}^m (n^2 - n) + 2n_{hs}}$$

onde, m é o número de famílias dentro de cada população, n é o número de progênies dentro de cada família; n_{hs} é o número de meio-irmãos paternos (a mesma árvore doadora de pólen cruzando com mais de uma árvore produtora de semente) entre diferentes famílias. θ_{xy} é o coeficiente de coancestria entre os irmãos x e y dentro de cada família. θ_{hs} é o coeficiente de coancestria entre os meio-irmãos paternos (0,125). Como os marcadores genéticos medem mais identidade por estado alélico do que por descendência, nós utilizamos uma restrição para aceitar que dois indivíduos de diferentes famílias fossem meio-irmãos paternos. O valor

esperado para o coeficiente de coancestria entre dois meio-irmãos paternos é 0,125, mas nós somente consideramos como meio-irmãos paternos, aqueles indivíduos cujo valor estimado para coeficiente de coancestria foi superior a 0,4. Nesses casos, os valores estimados foram substituídos por 0,125 para serem incluídos nas estimativas de grupo de coancestria.

3.2.3.4 – Sistema de Reprodução

O sistema de reprodução foi analisado com base nos modelos de reprodução mista (RITLAND; JAIN, 1981) e cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989) utilizando o programa “Multilocus MLTR” (RITLAND, 2002), usando o método de máxima verossimilhança (Algoritmo Newton-Rapson); Os parâmetros estimados foram a taxa populacional de cruzamento multiloco (t_m), taxa populacional de cruzamento uniloco (t_s), taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$) e correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$). O intervalo de confiança das estimativas foi obtido por 1000 reamostragens *bootstraps*. Como o número de progênies era baixo em algumas populações (<20) a unidade de reamostragem foram plantas dentro de progênies.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Diversidade genética

Todos os oito locos analisados foram polimórficos nas duas populações. Para o total de plantas genotipadas foram observados 118 alelos. As duas populações estudadas de *M. urundeuva* apresentaram um número maior de alelos do que tem sido observado em prévios estudos com a espécie. O total número de alelos (118) observado em *M. urundeuva* nas populações de Aramina e Selvíria foi superior ao observado por Caetano et al. (2005) (72 alelos) em populações do Paraguai e da Argentina. Entretanto, em trabalho mais recente, Caetano et al. (2008) estudando 1048 indivíduos de populações distribuídas por toda a América do Sul, observaram um total de 97 alelos com seis marcadores idênticos aos utilizados no trabalho. Quando utilizamos estes mesmos marcadores, encontramos nas populações de Aramina e Selvíria um total de 84 alelos. O elevado número de alelos e de diversidade genética observada nas duas populações (Aramina e Selvíria) de *M. urundeuva* denota a ocorrência de alta diversidade genética nas mesmas.

O número de alelos variou entre locos de 6 a 27 alelos, com média de 14,5 alelos/loco (Tabela 2). O número efetivo de alelos por locos foi muito menor do que o número de alelos totais por locos, variando entre locos de 2,15 a 6,99, com média de 4,05 alelos efetivos por loco, o que sugere que muitos alelos são raros ($p \leq 0,05$) ou tem baixa frequência (Figuras 11 a 18) ($0,05 > p < 0,25$). A heterozigosidade observada variou entre locos de 0,117 a 0,790, com média de 0,601. A diversidade genética variou de 0,833 a 0,962, com média de 0,912.

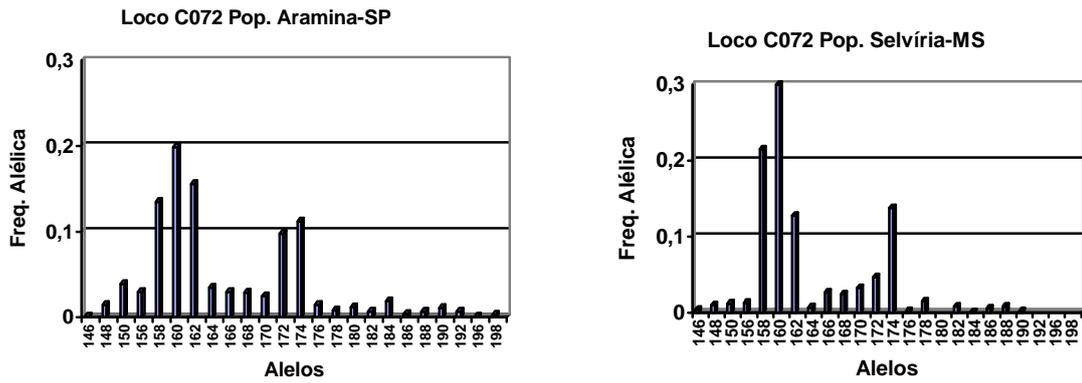


Figura 11 - Distribuição dos alelos no loco C072, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS

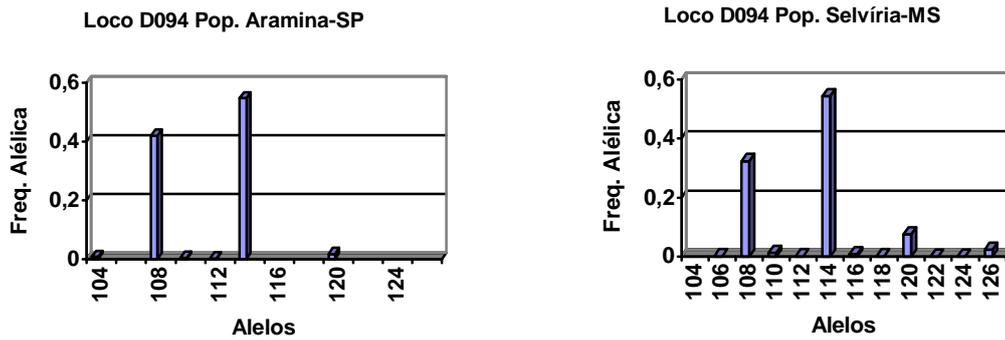


Figura 12 - Distribuição dos alelos no loco D094, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS

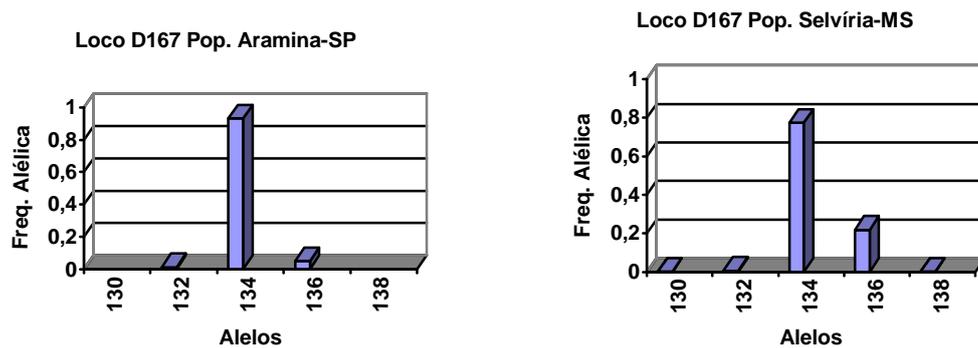


Figura 13 - Distribuição dos alelos no loco D167, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS

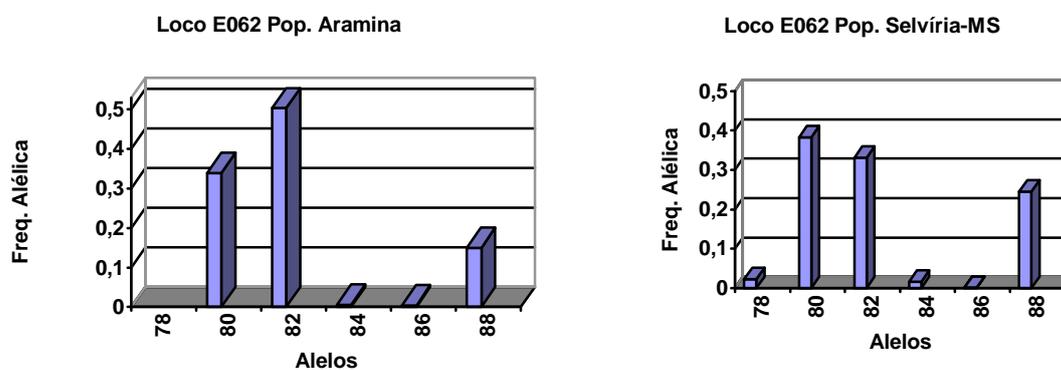


Figura 14 - Distribuição dos alelos no loco E062, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS.

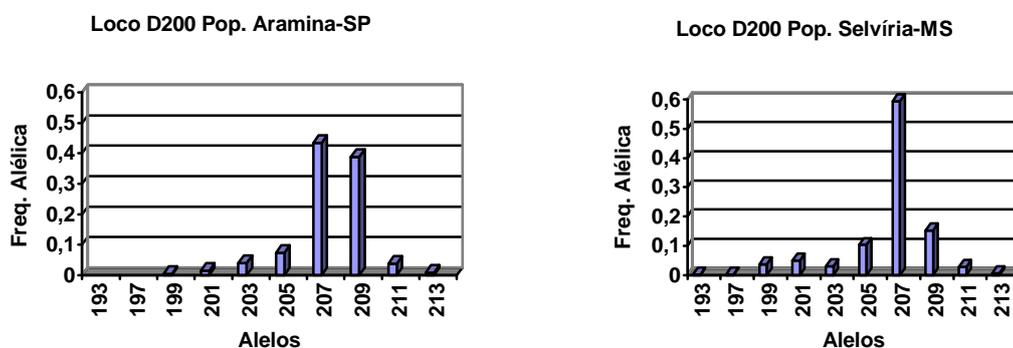


Figura 15 - Distribuição dos alelos no loco D200, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS.

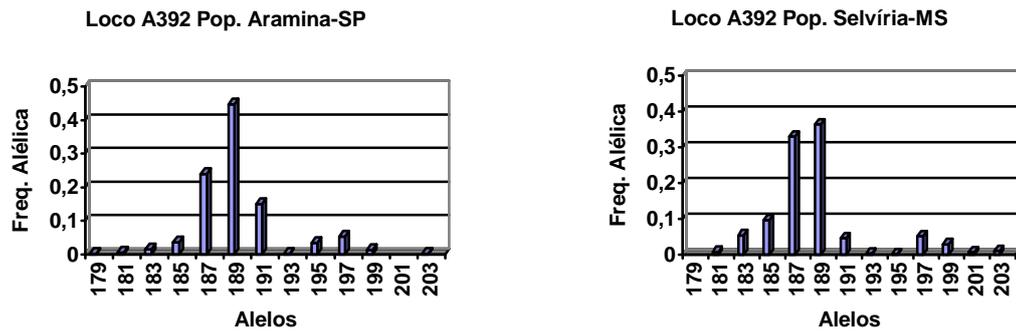


Figura 16 - Distribuição dos alelos no loco A392, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS.

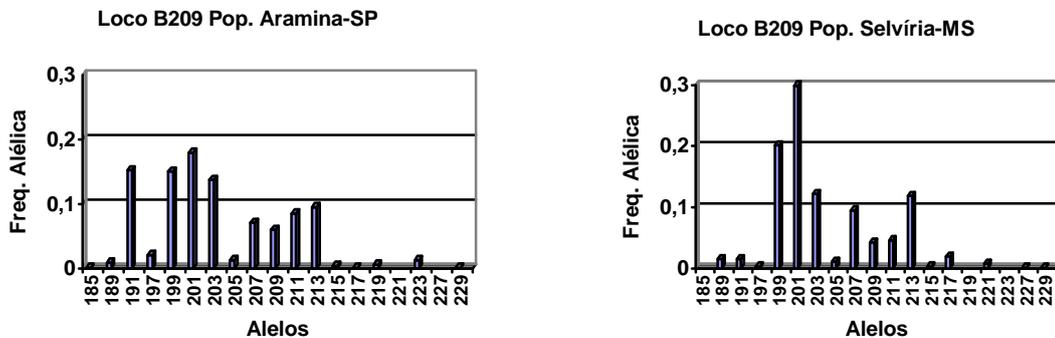


Figura 17 - Distribuição dos alelos no loco B209, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS.

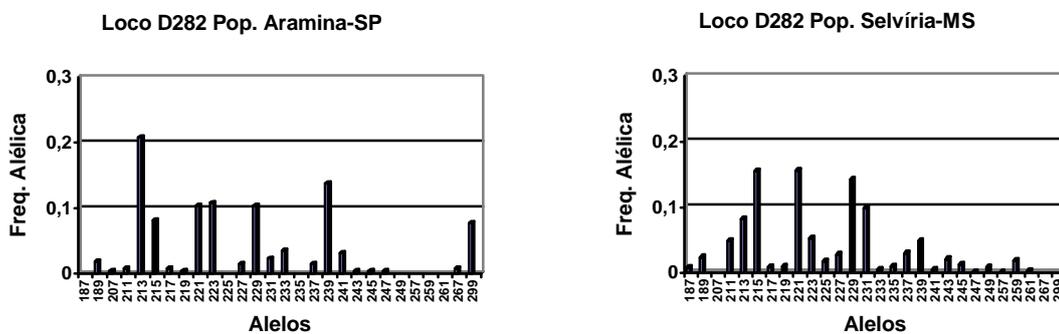


Figura 18 - Distribuição dos alelos no loco D282, em função da frequência alélica, nas populações de *M. urundeuva* provenientes de Aramina-SP e Selvíria-MS.

A população de Selvíria apresenta número superior de alelos ($A_t = 105$) em relação à Aramina ($A_t = 94$), o que pressupõem uma maior diversidade genética naquela população. Estes resultados indicam que a perturbação antrópica sofrida pela população de Aramina, mais recentemente devido à cultura de cana-de-açúcar e anteriormente devido às culturas de café e algodão, levou a uma redução de sua base genética e conseqüentemente de sua diversidade genética. Isso se deve a degradação sofrida no local para o plantio destas culturas que ocorreu de forma drástica, onde em pouquíssimo tempo a população de *M. urundeuva* foi dizimada quase que completamente, sobrando apenas pequenas ilhas de árvores onde não foi possível introduzir as monoculturas. Diferentemente a população de Selvíria teve sua degradação de forma mais lenta, pois sempre que havia necessidade de se expandir a área de pasto uma parte da mata nativa era devastada. Deve-se levar em consideração que a coleta de sementes destas populações foi realizada no ano de 1991, portanto os resultados aqui apresentados refletem a situação genética das populações naquele período. Assim, novos estudos baseados em progênies coletadas mais recentemente são importantes, pois irão refletir a atual situação genética da população, pois em curto prazo pode ter ocorrido deriva genética, e em longo prazo, pode haver aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de cruzamento entre indivíduos aparentados.

Tabela 2 - Estimativa de parâmetros genéticos em oito locos microssatélites para 978 indivíduos de duas populações de *Myracrodruon urundeuva*. A é o número de alelos por loco; A_e é o número efetivo de alelos por loco; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperada.

Locos	A	A_e	H_o	H_e
C072	24	6,99	0,774	0,857
D094	12	2,67	0,623	0,626
D167	6	2,15	0,117	0,536
D282	27	3,07	0,411	0,674
B209	19	6,53	0,656	0,847
A392	13	4,42	0,790	0,774
D200	10	3,25	0,623	0,692
E062	7	3,34	0,821	0,701
Média	14,75	4,05	0,601	0,713

Embora as amostras em cada população tivessem tamanhos muito similares (Tabela 3), a população Selvíria apresentou 11 alelos a mais que a população Aramina. A população Selvíria também apresentou um maior número de alelos exclusivos (23 alelos) em relação à população Aramina (12 alelos). Contudo, em ambas as populações, os alelos exclusivos tinham baixa frequência (variando de 0,025 a 0,001). O número médio de alelos por locos (A), o número de alelos efetivo por locos (A_e), a heterozigosidade observada (H_o) e a heterozigosidade esperada (H_e) foram sensivelmente maiores na população Selvíria do que em Aramina (Tabela 3). A população Selvíria apresentou também um maior número de alelos raros ($p \leq 0,05$) que a Aramina, 73 alelos (69,5%) contra 60 alelos na população Aramina (63,8%), respectivamente.

O índice de fixação foi positivo e relativamente alto em ambas as populações, sendo significativamente diferente de zero, a julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade, indicando possível endogamia nas populações (Tabela 3).

Neste trabalho, a alta porcentagem de alelos raros encontrados nas populações, indica o comprometimento das mesmas com a perda de diversidade genética, pela atuação de deriva genética. Tal fato é ainda mais acentuado na população de Selvíria onde o número de alelos raros é aparentemente maior. A porcentagem de alelos perdidos (geralmente alelos raros) é o melhor indicativo para demonstrar a perda de variabilidade genética em populações advindas de fragmentação. Assim, embora tenha sido detectada alta diversidade genética nestas populações, há possibilidade de que a deriva genética esteja atuando, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos. A fragmentação e o isolamento destas populações em decorrência das atividades antrópicas (pecuária extensiva e cultura da cana-de-açúcar) podem ser os agentes causais deste desequilíbrio na estrutura genética destas populações.

Tabela 3 - Estimativa de índices de diversidade genética para duas populações de *Myracrodruon urundeuva*. n é o número de indivíduos analisados; A_t é o número total de alelos; A é o número médio de alelos por loco; A_e é o número efetivo de alelos por loco; A_{excl} é o número de alelos exclusivos; A_r é o número de alelos raros; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperada; F é o índice de fixação.

Parâmetros	Populações	
	Aramina	Selvíria
n	492	486
A_t	94	105
A	11,75	13,135
A_e	3,105	3,984
A_{excl}	12	23
A_r	60	73
H_o	0,535	0,669
H_e	0,678	0,749
F (IC 95%)	0,210 (0,008 a 0,341)	0,107 (0,036 a 0,404)

IC: Intervalo de confiança a 95% de probabilidade, com 10 mil reamostragens *bootstrap* sobre os locos.

4.2 - Diferenciação genética entre populações

A diferenciação nas freqüências alélicas entre as duas populações para o pólen cruzado foi de 15,9%, indicando que aproximadamente 84% da diversidade genética está dentro das populações (Tabela 4) e a diferenciação nas freqüências alélicas para os óvulos (0,235) foi maior que a medida entre o pólen, indicando que aproximadamente 77% da diversidade genética está dentro de populações. A julgar pelo intervalo de confiança a 95% de

probabilidade, ambas as estimativas de diferenciação foram significativamente diferentes de zero.

Tabela 4 - Estimativa de diversidade genéticas e estatística G'_{ST} de Hedrick (2005) para o pólen e os óvulos de *Myracrodruon urundeuva*.

Loco	Pólen			Óvulos		
	H_S	H_T	G'_{ST}	H_S	H_T	G'_{ST}
D167	0,437	0,496	0,305	0,481	0,611	0,608
E062	0,641	0,663	0,153	0,488	0,488	0,001
D094	0,624	0,636	0,081	0,460	0,484	0,135
D200	0,727	0,733	0,057	0,624	0,679	0,350
A392	0,810	0,817	0,082	0,652	0,668	0,112
B209	0,871	0,882	0,181	0,795	0,808	0,145
C072	0,891	0,897	0,111	0,814	0,833	0,231
D282	0,900	0,914	0,305	0,881	0,898	0,300
Média	0,738	0,755	0,159	0,649	0,684	0,235
IC-sup (95%)	0,783	0,797	0,187	0,696	0,727	0,288
IC-inf (95%)	0,692	0,713	0,132	0,603	0,640	0,183

Intervalo de confiança a 95% de probabilidade, calculado por reamostragem *Jackknife* sobre locos.

A alta diferenciação genética detectada entre as duas populações, tanto a partir do pólen, quanto dos óvulos era esperada, considerando a grande distância que separa estas populações (~460 km). A diversidade genética mantida dentro e entre populações ocorre em função de eventos históricos e processos evolutivos recentes (LEE et al., 2002). Espécies tipicamente de cruzamento geralmente apresentam alta diversidade genética dentro e pequena entre populações, visto que a divergência genética entre populações é reduzida em função do aumento na taxa de fluxo gênico (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Contudo, populações

geograficamente e reprodutivamente isoladas entre si, devido a diferentes eventos históricos de colonização e dinâmicas populacionais são esperadas apresentarem maior diferenciação genética entre si do que populações localizadas espacialmente próximas e que trocam genes constantemente. O fluxo gênico pode homogeneizar a diversidade genética entre populações. Por outro lado, a ausência de fluxo gênico pode aumentar a diferenciação entre populações, chegando a alguns casos a dar origem a espécies diferentes. Outro fato a ser considerado é que mesmo que estas duas populações forem resultantes da fragmentação de uma única população, ainda assim poderiam atualmente ser geneticamente similares, desde que as condições ambientais e reprodutivas tivessem sido idêntica para ambas. Ou seja, provavelmente após a fragmentação, diferentes conjuntos de fatores bióticos e abióticos (como por exemplo: polinizadores, dispersores de semente, clima, solo, água, etc) atuaram em cada uma das populações estudadas, levando-as a diferirem também no processo de adaptação. Assim, a grande distância separando estas populações e, conseqüentemente, isolando-as reprodutivamente, somado a diferentes situações adaptativas que cada uma experimenta, pode explicar esta alta diferenciação genética observada entre estas duas populações.

4.3 - Tamanho efetivo populacional

O coeficiente de coancestria dentro das progênies (Tabela 5) foi maior que o esperado em progênies de meios-irmãos (0,125) em todas as progênies de ambas as populações, variando de 0,140 a 0,214 na população Aramina (média de 0,169) e de 0,137 a 0,210 na população Selvíria (média de 0,165). Por sua vez, o tamanho efetivo de cada progênie foi igualmente menor do que o esperado em progênies de populações panmíticas, variando de 2,14 a 3,57 na população Aramina (média de 2,96) e de 2,38 a 3,64 na população Selvíria

(média de 3,04). Já o coeficiente de coancestria de cada população (considera as coancestrias dentro de progênes mais as coancestrias de meio-irmãos paternos) foi de 0,007029 na população Aramina e 0,007412 na população Selvíria. O tamanho efetivo total da população Aramina foi estimado em 71,13 e o da população Selvíria em 67,46.

Tabela 5 - Estimativa de coeficientes de coancestria (Θ) e tamanho efetivo (N_e) para cada progênie e média populacional para duas populações sob conservação em banco de germoplasma de *Myracrodruon urundeuva*.

Progênes	População de Aramina			População de Selvíria		
	<i>n</i>	Θ	N_e	<i>n</i>	Θ	N_e
1	20	0,168	2,98	18	0,175	2,86
2	20	0,154	3,24	19	0,150	3,33
3	20	0,183	2,74	19	0,137	3,64
4	20	0,154	3,26	20	0,151	3,30
5	20	0,174	2,87	19	0,160	3,13
6	20	0,163	3,06	20	0,152	3,29
7	20	0,185	2,70	20	0,155	3,23
8	18	0,214	2,34	20	0,148	3,38
9	20	0,166	3,02	20	0,145	3,46
10	19	0,163	3,06	19	0,160	3,12
11	20	0,182	2,75	20	0,160	3,13
12	20	0,183	2,73	20	0,156	3,20
13	20	0,151	3,31	19	0,176	2,85
14	20	0,172	2,91	17	0,157	3,18
15	17	0,163	3,08	19	0,209	2,39
16	20	0,197	2,53	19	0,158	3,17
17	19	0,173	2,89	20	0,183	2,73
18	20	0,140	3,57	20	0,210	2,38
19	20	0,140	3,57	19	0,177	2,83
20	20	0,190	2,63	20	0,166	3,01
21	19	0,171	2,92	20	0,162	3,09
22	20	0,163	3,06	19	0,167	2,99
23	20	0,151	3,31	20	0,172	2,91
24	20	0,148	3,37	20	0,157	3,18
25	19	0,168	2,98	20	0,171	2,92
Média_prog	--	0,169	2,96	--	0,165	3,04
Total_pop	491	0,007029	71,13	486	0,007412	67,46
Esperado		--	100			100

Em espécies dióicas, o parentesco dentro de progênes de polinização aberta pode ser composto por misturas de meios-irmãos e irmãos-completos, dependendo de como ocorreu à reprodução, se foi aleatória ou correlacionada. Ainda, os valores de coancestria entre parentes podem ser maiores do que o esperado entre dois meios-irmãos (0,125) ou irmãos-completos (0,25), caso estes tenham sido gerados por cruzamentos entre parentes. O coeficiente de coancestria estimado dentro das progênes foi maior que o esperado em progênes de meio-irmãos em todas as progênes de ambas as populações. Isto indica que muitos dos cruzamentos foram correlacionados ou endogâmicos. A taxa de cruzamentos correlacionada pode ser estimada em espécies dióicas do coeficiente de coancestria médio dentro de progênes, usado a expressão sugerida por Sousa et al. (2005): $\Theta = 0.125(1 + F_p)(1 + r_p)$, em que F_p é o coeficiente de endogamia na geração parental (aqui $F_p = 0$ em ambas as populações) e r_p é a correlação de paternidade, a qual mede a proporção de progênes de cruzamentos que são irmãos-completos. Assumindo $F_p = 0$, conforme estimativa do índice de fixação em ambas as populações (Tabela 3) e isolando o r_p na expressão de Sousa et al. (2005) [$r_p = (\Theta/0,125) - 1$], estima-se uma correlação de paternidade de 0,35 e 0,32 nas populações Aramina e Selvíria, respectivamente. Portanto, aproximadamente 30% das progênes eram parentes no grau de irmãos-completos. Isto significa que as árvores matrizes de Aramina e Selvíria receberam pólen de poucas árvores doadoras (aproximadamente 2,9 e 3,1 árvores, $N_{ep} = 1/r_p$). Em outros termos, significa que as árvores matrizes destas populações possuem uma pequena vizinhança reprodutiva.

Quando consideramos todas as progênes conjuntamente, tem-se que levar em conta também o possível parentesco existente entre plantas de diferentes progênes, devido a uma mesma árvore paterna fertilizarem diferentes árvores matrizes simultaneamente, dando origem a meio-irmãos paternos. Nas análises dos dados, observou-se baixo coeficiente de

coancestria entre plantas nas populações ($<0,007$). Isso, em termos teóricos sugere que uma baixa endogamia poderia ser esperada pelo cruzamento aleatório no atual banco de germoplasma.

O entendimento da relação entre o tamanho efetivo e o tamanho real de uma população é de fundamental importância para o planejamento de estratégias de conservação. Sob cruzamentos perfeitamente aleatórios e se as progênies amostradas tivessem recebido pólen de diferentes conjuntos gênicos, o tamanho efetivo deste conjunto de progênies de cada população seria de 100 [$N_e = 4x(0,5/0,125)$]. Em outras palavras, estas 25 progênies compostas cada uma por 20 plantas e totalizando 500 plantas, representariam 100 plantas não parente e não endogâmicas. Neste caso, os tamanhos efetivos das duas populações poderiam ser somados, visto que não ocorreu sobreposição do conjunto gênico compartilhado pelas populações individualmente, devido ao isolamento geográfico. Então o tamanho efetivo total retido no banco neste caso seria de 200, ou em outros termos, as 1000 plantas representariam 200 plantas não parente e não endogâmicas. Contudo, o que se observou foi que os cruzamentos não foram aleatórios (parte foram correlacionados) e ocorreu sobreposição do conjunto gênico compartilhado pelas árvores matrizes dentro das populações. Se cada uma das progênies tivesse recebido pólen de diferentes conjuntos gênicos, os tamanhos efetivos estimados para cada progênie poderiam ser somados, o que resultaria em tamanhos efetivos de 74,9 e 76,7 nas populações Aramina e Selvíria, respectivamente. Contudo, esta estimativa não leva em consideração plantas parentes de diferentes progênies, parentes como meio-irmãos paternos, devido ao cruzamento de um mesmo pai com várias árvores matrizes. Quando isso foi considerado, o tamanho efetivo foi reduzido para 71,1 e 67,5 nas populações Aramina e Selvíria, respectivamente. Portanto, o banco tem um tamanho efetivo total de 138,6, ou seja, as 1000 plantas representam 139 plantas não parentes e não endogâmicas.

Uma grande utilidade prática da estimativa do tamanho efetivo é sua utilidade para estimar o número de árvores matrizes (m) para a coleta de sementes (SEBBENN, 2003). Sebbenn (2003) propôs que este número de matrizes pode ser estimado diretamente do tamanho efetivo alvo que se pretende conservar ou amostrar ($N_{e(reference)}$), dividido pelo tamanho efetivo médio das progênies, $m = N_{e(reference)} / N_e$. Esta expressão é baseada em três pressuposições básicas: i) as árvores matrizes onde é feita a coleta das sementes não são parentes entre si; ii) as árvores matrizes não fertilizam uma a outra e; iii) as árvores matrizes compartilham diferentes conjunto gênicos, ou seja, não existe sobreposição no conjunto gênico recebido pelas diferentes árvores (ausência de meios-irmãos paternos). Caso todas estas pressuposições sejam satisfeitas a expressão sugerida por Sebbenn (2003) é válida. Como *M. urundeuva* é dióico, a pressuposição ii é sempre verdadeira, visto que árvores fêmeas não cruzam umas com as outras. Por outro lado, as outras duas pressuposições são mais difíceis de serem satisfeitas. É necessário que sementes sejam coletadas a grandes distâncias para evitar que as árvores matrizes sejam parentes entre si e para que o seu conjunto gênico polínico não seja sobreposto. Portanto, a mínima distância entre matrizes para a coleta de sementes não pode ser determinada somente com base em informações na estrutura genética espacial das populações, mas sim também em informações na distância de dispersão de pólen e na área de vizinhança reprodutiva. Este tipo de estudo falta em *M. urundeuva*, bem como na grande maioria das espécies arbóreas. Como exemplo, assumindo que todas as três pressuposições citadas são validas e que o objetivo é reter uma amostra com um tamanho efetivo de 150, o número médio de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes seria de 51 ($m = 150/2,96$) na população Aramina e de 49 ($m = 150/3,04$) na Selvíria. Contudo, como no presente caso, pelo menos a pressuposição iii é sabidamente violada, visto que se detectou sobreposição no conjunto gênico recebido pelas diferentes árvores matrizes, este número de árvores matrizes pode ser determinado de outra forma, usando uma simples

regra de três. Por exemplo, se estas sementes de polinização aberta de 25 matrizes representam tamanhos efetivos de 71,1 e 67,46, para ter-se um tamanho efetivo de 150 na amostra seria necessário coletar sementes de 53 ($m = N_{e(\text{reference})} \times n_{\text{matrizes}} / N_e = 150 \times 25 / 77,1$, em que n_{matrizes} é o número de árvores matrizes onde foi feita a coleta de sementes) árvores matrizes na população Aramina e de 56 ($m = 150 \times 25 / 67,46$) árvores matrizes na população Selvíria. Portanto, seriam necessárias amostras de mais 28 e 31 árvores matrizes das populações Aramina e Selvíria para reter o tamanho efetivo de referência de 150 de cada população.

Finalmente, os resultados obtidos nas populações estudadas de *M. urundeuva*, mostram que existe a possibilidade de utilização destas em programas de conservação e melhoramento genético. Por apresentarem uma alta diversidade genética, mais acentuada na população de Selvíria, essas populações podem ser utilizadas em programas de conservação, desde que o tamanho efetivo populacional conservado *ex situ* seja aumentado significativamente, visto que a presença de parentesco entre e dentro de progênies reduziu substancialmente o tamanho efetivo das amostras.

4.4 - Sistema de Reprodução

A estimativa da taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m) foi alta para a população de Aramina ($1,000 \pm 0,000$) assim como para Selvíria ($1,000 \pm 0,001$) (Tabela 6). As altas taxas de cruzamentos multilocos detectadas confirmam que a espécie é predominantemente de cruzamento. A estimativa da taxa de cruzamento unilocos que diz respeito ao cruzamento entre indivíduos não aparentados (\hat{t}_s) foi igualmente alta para Aramina ($0,989 \pm 0,003$), assim como para Selvíria ($0,999 \pm 0,001$) e próxima aos resultados estimados para \hat{t}_m , confirmando que a espécie é obrigatoriamente de cruzamento.

Resultados semelhantes obtidos em populações de espécies arbóreas tropicais tem sido relatado em diversos estudos do sistema de reprodução como *Shorea* sp. (MURAWSKI et al., 1994), *Shorea leprosula* (LEE et al., 2000), *Cariniana legalis* (SEBBENN et al., 2000), *Esenbeckia leiocarpa* (SEOANE et al., 2001), *Chorisia speciosa* (SOUZA et al., 2003), *Caesalpinia echinata* (GIUDICE NETO et al., 2005), *Eschweilera ovata* (GUSSON et al., 2005) e *Solanum lycocarpum* (MARTINS et al., 2006).

A estimativa de diferença entre a taxa de cruzamento multilocos e unilocos ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) tem sido utilizada para quantificar a ocorrência de cruzamentos endogâmicos ou, em outros termos, entre indivíduos aparentados (GUSSON et al., 2005). A diferença entre a taxa de cruzamento multilocos e unilocos ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) para Aramina foi de 0,011 ($\pm 0,003$) e para a população de Selvíria foi de 0,001 ($\pm 0,001$). A julgar pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade, obtida para a diferença ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), a estimativa da taxa de cruzamentos entre parentes é estatisticamente diferente de zero. Assim verificou-se que na população de Aramina há uma proporção de cruzamentos entre indivíduos aparentados, aumentando a endogamia e o parentesco nas progênes, acima do esperado pelas expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (meios-irmãos) e indica que existe algum grau de estruturação na população.

Tabela 6 - Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em populações de *Myracrodruon urundeuva*, onde *Mat.* é o número de matrizes; *n* é o número de progênies; t_m e t_s são as estimativas da taxa de cruzamento multilocos e unilocos, respectivamente; $t_m - t_s$ é a taxa de cruzamento entre parentes; $r_{p(m)}$ é a correlação de paternidade.

Populações		
Parâmetro	Aramina-SP (IC95%)	Selvíria-MS (IC95%)
Mat.	25	25
<i>N</i>	492	486
\hat{t}_m	1,000 (0,000)	1,000 (0,001)
\hat{t}_s	0,989 (0,003)	0,999 (0,001)
$\hat{t}_m - \hat{t}_s$	0,011 (0,003)	0,001 (0,001)
$\hat{r}_{p(m)}$	0,163 (0,029)	0,213 (0,021)

O sistema misto de reprodução tem sido conceituado como a mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundações e desconsidera a ocorrência de cruzamentos correlacionados, que também pode causar desvios de cruzamentos aleatórios (AZEVEDO, 2007). Os cruzamentos correlacionados podem ser calculados pela correlação de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$), que mede a proporção de indivíduos que foram gerados por cruzamentos correlacionados (irmãos completos) (RITLAND, 1989). A estimativa de correlação multilocos de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$) na população de Aramina mostrou que 16,3% das progênies foram geradas por cruzamentos correlacionados e são parentes no grau de irmãos completos e 83,7% meios-irmãos. Na população de Selvíria a proporção de irmãos completos foi de 21,3% e 78,7% de meios-irmãos. A estimativa da correlação de paternidade em *M. urundeuva* foi relativamente alta para as duas populações. Taxas elevadas de cruzamentos biparentais podem ser conseqüências

de variações na fenologia do florescimento, reduzindo o tamanho efetivo da vizinhança reprodutiva, ou devido a pequena quantidade de indivíduos reprodutivos na vizinhança, ou ainda, baixa densidade de polinizadores. A ocorrência de variações na fenologia do florescimento pode restringir o número de parentais que participam da reprodução, em especial em populações pequenas, forçando a ocorrência de cruzamentos biparentais.

5 – CONCLUSÕES

- Existe alta diversidade genética nas populações conservadas *ex situ*, embora também exista endogamia.
- No longo prazo, pode ocorrer aumento da endogamia, devido à maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados.
- A diversidade genética na população Aramina sofreu um maior efeito da intervenção antrópica.
- A maior diversidade genética encontra-se dentro das populações.
- Ocorreu cruzamento entre indivíduos parentes nas populações.
- As progênies de polinização aberta são compostas por misturas de meios irmãos e irmãos completos.
- A estratégia de conservar parte desta diversidade natural *ex situ* foi eficiente, e poderá contribuir para o repovoamento das populações naturais, assim como podem ser utilizadas em programas de melhoramento genético da espécie.

6 - REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.V. **Emprego de parâmetros moleculares e quantitativos na conservação e melhoramento de *Eugenia dysenterica* DC.** 2004. 186f. Tese (Doutorado) – Escola de Agronomia e Engenharia de alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.

AZEVEDO, V.C.R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae.** 1992. 215f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

AZEVEDO, V.C.R.; KANASHIRO, M.; GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A.Y. Variabilidade no cpDNA em *Manilkara huberi*, espécie sob manejo sustentável na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.7, p.859-867, 2008.

BAZZAZ, F.A. Regeneration of tropical Forest: physiological responses of pioneer and secondary species. In: GÓMEZ-POMPA, A.; WHITMORE, T.C.; HADLEY, M. **Rain forest regeneration and management.** Paris: UNESCO, 1991. 458p.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste: especialmente do Ceará.** 4.ed. Natal: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1990. 315 p.

BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. A simple and cost effective method to synthesize a fluorescent labeled internal DNA standard for fragment sizing in an automatic sequencer. **Biotechniques**, Natick, v.31, n.4, p.793-800, 2001.

CAETANO, S.; SILVEIRA, P.; SPICHIGER, R.; NACIRI-GRAVEN, Y. Identification of microsatellite markers in a neotropical seasonally dry Forest tree, *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n.1, p.21-23, 2005.

CAETANO, S.; PRADO, D.; PENNINGTON, R.T.; BECK, S.; OLIVEIRA-FILHO, A.; SPICHIGER, R.; NACIRI, Y. The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v.13,n.17, p.3147-3159, 2008.

CAIXETA, R.P. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**, Viçosa, v 27. n.3, p 357-363, 2003.

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

CAVALLARI, M.M. **Estrutura genética de populações de Encholirium (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. 2004. 92f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lawrence, v. 23, n.1, p.72–84, 1969.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, Lund, v.83, n.6, p.748-756, 1999.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding

in *Cariocar brasiliense*, and endangered tropical tree species. **Heredity**, Lund, v.86, n.1, p. 60-67, 2001.

DICK, C.W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and Africa honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, n.3, p.753-764, 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.1, n.12, p.13-15, 1990.

ENGELBORGHIS, I.; SWENNEN, R.; VAN CAMPENHOUT, S. Capacidad del AFLP para detectar diferencias genéticas y variantes somaclonales en *Musa* spp. **Infomusa**, Montpellier, v.76, n.2, p.3-6, 1998.

ERICKSON, D.L.; HAMRICK, J.L.; KOCHERT, G.D. Ecological determinants of genetic diversity in an expanding population of the shrub *Myrica cerifera*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n.6, p.1655-1664, 2004.

ETTORI, L.C.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, A.C.S.; BOAS, O.V. Variabilidade genética em duas populações de *Cordia trichotoma*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.11, n.2, p.179-187, 1999.

FAO **Databook on endangered tree and shrub species and provenances**. Roma: Itália, 1986. p.116-25.

FERNANDEZ, J.; GONZALEZ-MARTINEZ, E.S.C. Allocating individuals to avoid inbreeding in ex situ conservation plantations: so far, so good. **Conservation Genetics**, Netherlands, v.10, n.1, p.45-57, 2009.

FREITAS, M.L.M.; AUKAR, A.P.A.; SEBBENN, A.M.; MORAES, M.L.T.; LEMOS, E.G.M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.2, n.68, p.21-28, 2005.

FREITAS, M.L.M.; AUKAR, A.P.A.; SEBBENN, A.M.; MORAES, M.L.T.; LEMOS, E.G.M. Variação genética em progênies de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão em três sistemas de cultivo. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.3, p.319-329, 2006.

GIUDICE NETO, J.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de uma população “ex situ” de *Caesalpinia echinata* Lam. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.3, n.69, p.125-133, 2005.

GONZAGA, T.W.C.; MATA, M.E.R.M.C.; SILVA, H.; DUARTE, M.E.M. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.2, p.145-154, 2003.

GOUDET, J.; PERRIN, N.; WASERT, P. Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n.6, p.1103-1114, 2002.

GUSSON, E.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade e estrutura genética especial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.1, n.67, p.123-135, 2005.

HARDY, O., VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.2, n.4, p.618–620, 2002.

HEDRICK, P.W. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, Lawrence, v.53, n.2, p. 313-318, 1999.

HEDRICK, F. A standardized genetic differentiation measured. **Evolution**, Lawrence, v.59, n.11, p.1633-1638, 2005.

IDURY, R.M, CARDON, L.R. A Simple Method for Automated Allele Binning in Microsatellite Markers. **Genome Research**, Netherlands, v.11, n.7, p.1104-1109, 1997.

ISHIHATA, L. **Bases para seleção de áreas prioritárias para a implantação de unidades de conservação em regiões fragmentadas**. 1999. 200f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação “in situ” de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, Piracicaba, v.1, n.35, p.7-37, 1987.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da conservação da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.12, n.32, p.65-70, 1998.

KAGEYAMA, P.Y.; CUNHA, G.C.; BARRETO, K.D.; CAMARGO, F.R.A.; SEBBENN, A.M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorífera* (Lauraceae). **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v.2, n.64, p.108-119, 2003.

KEIDING, H.J. Seed procurement for species and provenance research. In: BURLEY, J.; WOOD, J.P. (Ed). **A manual on species and provenance research with particular reference to the tropics**. Oxford: Commonwealth Forestry Institute, 1976. 313p.

LACERDA, C.M.B.; KAGEYAMA, P.Y.; FERRAZ, E.M.; Diversidade isoenzimática em *Myracrodruon urundeuva* em duas situações antrópicas no semi-árido. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.1, n.55, p.89-95, 1999.

LACERDA, C.M.B.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Alemão na região semi-árida, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.2, p.145-150, 2003.

LEE, S.W.; WICKNESWARI, R.; MAHANI, M.C.; ZAKRI, A.H.; Mating system parameters in a tropical tree species *Shorea leprosula* Miq. (Dipterocarpaceae), from Malaysian lowland dipterocarp forest. **Biotropica**, Lawrence, v.32, n.4, p.693-702, 2000.

LEE, S.L.; NORWATI, A.; SALWANA, M.H.S.; LEE, C.T.; NORWATI, M. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. **American Journal of botany**, St. Louis, v.1, n.89, p.447-459, 2002.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **GDA - genetic data analysis**: version 1.1 for Windows 95/NT. Storrs: [s.n.], 2002. Disponível em: <<http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>>. Acesso em: 14 fev 2008.

LOISELLE, B.A. ; SORK, V.L. ; NASON, J. ; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of botany**, St. Louis, v.82, n.11, p.1420–1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368p.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.15, n.3, p.65-95, 1984.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Fichas características de madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT, 1989. 49p.

MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, Netherlands, v.7, n.6, p.957-969, 2006.

MORAES, M.L.T. **Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão - Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler)**. 1992. 139f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

MORAES, M.L.T.; FREITAS, M.L.M. **Resumos Embrapa – CPAO/Flora Sul**. Dourados: [s.n.], 1997. p.9. (Boletins informativos).

MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas **Revista Árvore**, Viçosa, v.2, n.29, p.281-289, 2005.

MURAWSHI, D.A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forest. **Biotropica**, Lawrence, v.26, n.1, p.23-29, 1994.

OLIVEIRA, C.A.M.; SILVA, E.F.; MOLICA, S.G.; FERREIRA, R.L.C.; LIRA, D.A.S.; BARROS JÚNIOR, J.A.B. Diversidade e estrutura genética em populações de *Caesalpinia echinata* (Lam.) na Estação Ecológica do Tapacurá, PE, **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.1, n.70, p.77-83, 2006.

PINTO, S.I.C.; SOUZA, A.M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffi* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.1, n.65, p.40-48, 2004.

PUTZ, F.E.; REDFORD, K.H.; ROBINSON, J.G.; FIMBEL, R.; BLATE, G.M. Tropical Forest management and conservation of biodiversity: an overview. **Conservation Biology**, Netherlands, v. 15, n. 1, p.7-20, 2000.

QUEIROZ, C.R.A.A.; MARAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos de aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, Viçosa, v.4, n.26, p.485-492, 2002.

RAJORA, O.P.; RAHMAN, M.H.; BUCHERT, G.P.; DANCİK, B.P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, Oxford, v.9, n.3, p.339-348, 2000.

RAJORA, O.M.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources **Euphytica**, Wageningen, v.118, n.2, p.197-212, 2001.

REIS, A.M.M. **Distribuição da variabilidade genética em aroeira (*Myracrodruon urundeuva* – Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de dpDNA**. 1999. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

REIS, A.M.M.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD variation in a germplasm collection of *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae), an endangered tropical tree: Recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Netherlands, v.51, n.5, p.529-538, 2004.

RESENDE, M.D.V. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 969p.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, Lund, v.47, n.2, p.35-52, 1981.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution** Lawrence, v.43, n.4, p.848-859, 1989.

RITLAND, K. Inferring the genetic basis of inbreeding depression in plants. **Genome**, Ottawa, v.39, n.1, p.1-8, 1996.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**: version 3.0. Canada: University of British Columbia, 2002. Disponível em: <<http://kritland@interchange.ubc.ca>>. Acesso em: 14 fev 2008.

SAMPAIO, P.T.B.; RESENDE, M.S.V.; ARAUJO, A.J. Estimates of genetic parameters and selection methods for genetic improvement of *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2243-2253, 2000.

SANTOS, E. **Nossas madeiras**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1987. 316p.

SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, A.C.E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: implicações para a

conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.2, n.58, p.25-40, 2000.

SEBBENN, A.M.; ETTORI, L.C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênies misto. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.22, n.13, p.201-211, 2001.

SEBBENN, A.M. Tamanho amostral para conservação “*ex situ*” de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, n.2, p.147-162, 2003.

SEGARRA-MORAGUES, J.G.; PALOP-ESTEBAN, M.; GONZA'LEZ-CANDELAS, F.; CATALAN, P. On the verge of extinction: genetics of the critically endangered Iberian plant species, *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae) and implications for conservation management. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n.4, p.969–982, 2005.

SEOANE, C.E.C.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.22, n.13, p.19-26, 2001.

SILVA, C.L.S.P.; MORAES, M.L.T.; VIEGAS, M.P.; CAMPOS, A.P.S.; LOURENÇÃO, J.C.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M.; ANDRADE, J.A.C.; CERESINI, P.C. Um método eficiente de extração de DNA de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) **Cultura Agrônômica**, Ilha Solteira, 19 p, 2008. (Artigo Submetido)

SOUSA, V.A.; SEBBENN, A.M.; HATTEMER, H.; ZIEHE, M. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest. Genet**, v.12, n.32, p.107–119, 2005.

SOUZA, L.M.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St.-Hill (Bombacaceae). **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v.26, n.3, p.113-121, 2003.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity**, Lund, v.2, n.43, p.105-111, 1984.