

Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae)

Genetic diversity and spatial autocorrelation in *Ocotea odorifera* (Lauraceae) populations

Paulo Yoshio Kageyama
Girlei Costa da Cunha
Klaus Duarte Barreto
Flavio Bertin Gandara
Fausto Rodrigues Alves Camargo
Alexandre Magno Sebbenn

RESUMO: Examinaram-se por locos isoenzimáticos os níveis de diversidade genética e a distribuição espacial de genótipos de *Ocotea odorifera* (canela sassafrás), em dois fragmentos (Matas da Cabine de Força - MCF; Mata do Aeroporto - MA) localizados em Capão Bonito, SP. A análise de distribuição das frequências alélicas entre populações mostrou baixa diferenciação (0,028). As análises dos genótipos de *O. odorifera* revelaram altos índices de diversidade genética nas populações, como média de 2,36 alelos por loco (\hat{A}), 67,8% de locos polimórficos a 95% de probabilidade ($\hat{P}_{95\%}$), 0,360 de diversidade gênica esperada (\hat{H}_e) e 0,005 de endogamia (\hat{f}). A coancestria na população MA foi alta 0,098, apesar de não significativa. A análise de autocorrelação espacial, a partir do índice I de Moran, evidenciou fracos indícios de estruturação genética espacial nas populações. Na maior população (MCF) foi detectado indicio de estruturação entre a distância de 35m a 74m e o correlograma total dos alelos foi significativo em 29,2% dos casos. Na menor população (MA) foi observado indicio de estruturação somente na classe de 0m a 22m, contudo, fracos e o correlograma total dos alelos não foi significativo para nenhum dos casos, confirmando a tendência a ausência de estruturação.

PALAVRAS-CHAVE: *Ocotea odorifera*, Espécies arbóreas tropicais, Diversidade genética, Índice I de Moran, Fragmentação

ABSTRACT: Levels of genetic diversity and spatial distribution of allozyme loci genotypes of *Ocotea odorifera* (canela sassafrás) were examined in two fragments (Matas da Cabine de Força - MCF; Mata do Aeroporto - MA) in Capão Bonito, SP. The analysis of allele frequencies distribution among populations showed low differentiation (0.028). The analysis of *O. odorifera* genotype in the populations revealed high levels of genetic diversity, with means of 2.36 alleles per locus (\hat{A}), 67.8% of polymorphic loci ($\hat{P}_{95\%}$), 0.360 of gene diversity (\hat{H}_e) and low fixation index ($\hat{f} = 0.005$). The coefficient of coancestry within of MA populations was high (0.98), but was not significant. The analysis of spatial autocorrelation, by Moran's I index, evidenced weak

possibility of spatial genetic structure. In the larger population (MCF) was detected evidences of spatial genetic structure between 35m to 74 m and the allele total correlogram was significant in 29.2% of cases, reinforcing the hypothesis of spatial genetic structure. In the small population (MA) was observed evidences of spatial genetic structure only from 0 m to 22 m class, but weak. The allele total correlogram was not significant for neither alleles, confirming the tendency to absence of structure.

KEYWORDS: *Ocotea odorifera*, Tropical tree species, Genetic diversity, Moran's I index, Fragmentation

INTRODUÇÃO

Ocotea odorifera (Vellozo) Rohwer ou canela-sassafrás é uma espécie arbórea tropical que pode atingir 25 m de altura e 70 cm de diâmetro na altura do peito (DAP). Suas flores são hermafroditas. A espécie apresenta ampla distribuição geográfica que vai do Sul da Bahia (15° S) ao estado do Rio Grande do Sul (29° 50'S), sendo também encontrada na Argentina e no Paraguai. A dispersão é irregular e descontínua, chegando em determinadas áreas a constituir densos povoamentos e em outras áreas é rara. *O. odorifera* habita principalmente a Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) desde as formações baixo Montana até a Alto-Montana, ocorre também na Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucária), na Floresta Estacional Semidecidual, nas formações Aluvial e Montana, Floresta Estacional Decidual e nos campos rupestres ou de altitude da Serra da Mantiqueira. Nesses ambientes ocorre entre 10 m e 1.200 m de altitude (Carvalho, 1994). A ampla distribuição geográfica é um indicativo que a espécie possa apresentar altos níveis de diversidade genética, o que pode lhe conferir a capacidade de ocupar diferentes habitats.

A espécie é uma importante fonte de madeira e óleo essencial (óleo sassafrás). O óleo sassafrás é extraído do tronco, raízes, casca e folhas. Sua exploração como fonte de óleo de sassafrás tem ocorrido de forma desordenada, principalmente confinado ao estado de Santa Catarina, que é a única área a conter árvores com conteúdo de safrol suficientemente alto. Estudos demonstram que existem variações na composição química do óleo sassafrás, de acordo com a região de ocorrência (Carvalho, 1994).

No clima frio do Vale do Itajaí, em Santa Catarina, produz safrol, um óleo essencial de valor comercial e alto valor econômico. Já no ambiente tropical do Rio de Janeiro, a principal substância produzida é a nitrofeniletano, que confere a esse espécie o cheiro de canela (FAPESP, 1999).

O. odorifera está na lista oficial de espécies da flora ameaçadas de extinção na categoria de espécie em perigo (Portaria Ibama Nº 37-N, de 3 de abril de 1992). Ela também está na lista das espécies raras ou ameaçadas de extinção nos estados de Santa Catarina (Klein, 1993) e Minas Gerais (Fundação Biodiversitas, s.d). Segundo Vieira (1999), *O. odorifera* é uma das espécies de plantas aromáticas e medicinais brasileiras com maior prioridade para a coleção de germoplasma e conservação genética. A exploração de canela-sassafrás com vistas a obter óleo essencial rico em safrol ocorreu segundo um modelo extrativista durante várias décadas, levando a espécie ao risco de extinção. A biomassa de raízes, cascas e folhas foi amplamente utilizada pela indústria para extração de óleo essencial (EMBRAPA, 1998). A justificativa para a exploração dessa espécie advém do fato de, em média, 80% da essência de sassafrás ser constituída por safrol. No entanto, outros compostos de interesse das indústrias química e farmacêutica têm sido identificados na fração de óleo essencial da espécie (Silva et al., 2001).

Apesar do grande valor econômico de *O. odorifera* e do avançado estado de erosão genética de suas populações, pondo em risco a sobrevivência da espécie, não existem estudos visando conhecer os níveis de diversidade genética nas suas populações para a conserva-

ção *in situ* e *ex situ*. O delineamento de estratégias para a conservação de uma espécie passa pelo entendimento de sua forma de reprodução, distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações, níveis de diversidade intrapopulacional, tamanho efetivo e distribuição espacial dos genótipos. Tendo isso em vista, estudou-se no estado de São Paulo, o potencial de duas populações fragmentadas de *O. odorifera* para a conservação genética *in situ*. O objetivo do trabalho foi descrever os níveis de diversidade genética intrapopulacionais, a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações e a distribuição espacial de genótipos em duas populações naturais da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O trabalho foi desenvolvido em dois fragmentos florestais (Mata da Cabine de Força -

MCF; Mata do Aeroporto - MA), da Fazenda Santa Inês de propriedade da Votorantim Celulose e Papel S.A. (VCP) no município de Capão Bonito (SP). A Tabela 1 e as Figuras 1 e 2 demonstram características do local e das populações amostradas. Observe-se nas Figuras 1 e 2, que praticamente todos os indivíduos foram amostrados na população MA.

Folhas jovens foram coletadas em 26 árvores adultas por população, embaladas em sacos plásticos identificados com o número da árvore de origem e acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo, isolado das amostras por camadas de folhas de jornal. Cada árvore amostrada teve também suas coordenadas geográficas medidas com auxílio de GPS. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP imediatamente após a coleta e armazenadas em geladeira a 5° Celcius.

Tabela 1

Amostragem, coordenadas geográficas e características das populações de *O. odorifera*. (Sampling, geographic coordinate and characteristics of *O. odorifera* populations)

População	Área (ha)	D (ind./ha)	N	n	Lat. (S)	Long. (W)	Alt. (m)
MCF	166,1	24,6	~ 120	26	23° 58'	48° 22'	653
MA	30,0	20,0	~ 29	26	23° 54'	48° 20'	636

D = densidade de indivíduos por hectare; N = tamanho da população; n = tamanho da amostra; MCF = Mata da Cabine de Força; MA = Mata do Aeroporto.

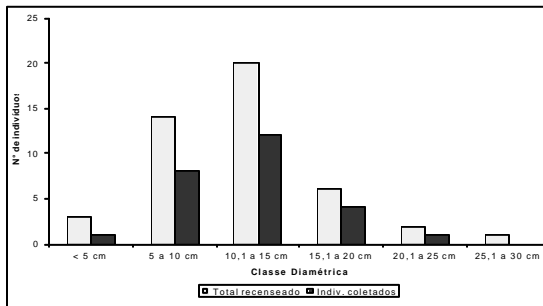


Figura 1

Distribuição diamétrica para o total de indivíduos recenseados e amostrados em *O. odorifera*, na Mata da Cabine de Força (MCF). (Diametric distribution for individuals total sampled in *O. odorifera*, Mata da Cabine de Força (MCF))

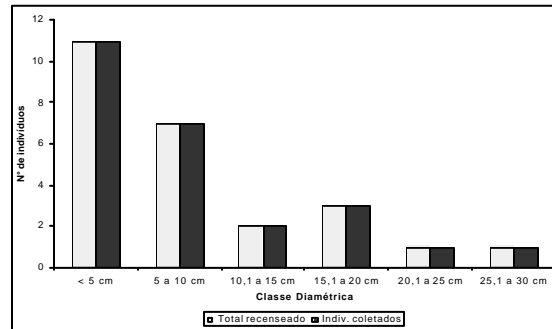


Figura 2

Distribuição diamétrica para o total de indivíduos recenseados e amostrados em *O. odorifera*, na Mata do Aeroporto (MA). (Diametric distribution for individuals total sampled in *O. odorifera*, Mata do Aeroporto (MA))

As plantas foram avaliadas por eletroforese de isoenzimas horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%. As "corridas" foram realizadas em geladeira, com temperatura de 5° Celsius, mantendo-se a corrente constantes em 35 miliampères nos eletrodos. As enzimas foram extraídas dos tecidos foliares, empregando-se aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil pirrolidona (PVP 40), 7mg de Polivinil pirrolidona (PVP-360) e 200 microlitros da solução de extração número 1 de Alfenas (1998). Foram avaliados 14 locos em sete sistemas isoenzimáticos: 6-fosfogluconato desidrogenase (6Pgdh1, 6Pgdh2 e 6Pgdh3), diaforase (Dia1 e Dia2), malato desidrogenase (Mdh1 e Mdh2), alfa-esterase (Est1 e Est2), fosfoglucose isomerase (Pgi1, Pgi2), NADH-desidrogenase (Nad1) e Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6pdh1 e G6pdh2), revelados no tampão de cuba/gel Citrato Morfolina (CM, pH 6.1 - Clayton e Tretick, 1972). As receitas de revelação das isoenzimas são as mesmas descritas em Alfenas (1998). Os locos foram designados seqüencialmente com o alelo de maior migração anodal denominado de 1, o próximo 2, e assim por diante. Contudo, a base genética dos locos não foi testada por cruzamentos controlados, mas as enzimas selecionadas expressaram fenótipos consistentes em estrutura de subunidades e interpretação genética de outros estudos em plantas, como documentado por (Wendel e Weeden, 1989; Alfenas, 1998).

Análise estatística

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi caracterizada pela análise de variância de frequências alélicas, com base em Weir (1996). As análises da variância foram realizadas considerando a estruturas hierárquicas de genes/indivíduos/populações. As estimativas dos componentes da variância

para os diversos níveis de hierarquia foram obtidas segundo Weir (1996). Dos componentes de variância estimaram-se a divergência genética entre populações (\hat{q}_p), o índice de fixação médio do conjunto das populações (\hat{F}) e o índice de fixação médio dentro de populações (\hat{f}). Para verificar se as respectivas estimativas eram diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança a 95% de probabilidade por reamostragem *bootstrap*. Utilizaram-se 10.000 repetições sobre os locos. As análises de variâncias, descritas acima e os bootstraps foram obtidos usando o programa GDA (Lewis e Zaykin, 1999).

O fluxo gênico aparente ($\hat{N}m$) entre populações foi estimado de forma indireta, segundo modelo de ilhas proposto por Crow e Aoki (1984), o qual corrige a análise para pequeno número de populações,

$$\hat{N}m = \frac{1}{4a} \left(\frac{1}{\hat{F}_{ST}} - 1 \right),$$

em que, \hat{F}_{ST} a divergência genética entre populações e a correção para o número de populações (n), sendo: $a = [n/(n-1)]^2$. Substituiu-se \hat{F}_{ST} por \hat{q}_p , conforme sugerem Cockerham e Weir (1993), para uma estimação de fluxo gênico não viesada.

A diversidade genética intrapopulacional foi analisada pelos índices de diversidade, estimados a partir do programa BIOSYS-1 (Swofford e Selander, 1989). Os índices estimados foram: número médio de alelos por loco (\hat{A}), porcentagem de locos polimórficos a 95% de probabilidade ($\hat{p}_{95\%}$), heterozigosidade observada (\hat{H}_o), diversidade gênica esperada (\hat{H}_e), índice de fixação não viesado (\hat{F}), estimado de acordo com Weir (1996) e tamanho efetivo (\hat{N}_e), estimado de acordo com Li (1976). Foi também estimado o coeficiente médio de coancestria dentro das populações (\hat{q}) com base em Queller e Goodnight (1989).

Para verificar se os valores médios do índice \hat{F} eram estatisticamente diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança a 95% de probabilidade por reamostragem *bootstrap*, utilizando-se 10.000 reamostragens sobre os locos, através do programa GDA de Lewis e Zaykin (1999).

A análise de autocorrelação genética espacial foi realizada individualmente em cada população. As coordenadas geográficas de cada árvore foram transformadas de graus, minutos e segundos para somente graus. Para análise de autocorrelação espacial, os dados de cada genótipo foram codificados para suas frequências alélicas, ou seja, quando o genótipo era homocigoto para o alelo sob análise recebeu valor 1,0, quando heterocigoto recebeu valor 0,5 e quando homocigoto para outro alelo recebeu valor 0,0 (Sokal e Oden, 1978). Se o loco era dialélico, e tinha frequência menor do que 0,95 e maior do que 0,05, ele foi usado, mas a análise foi feita apenas para um dos alelos, já que o segundo contribui com informações idênticas ao primeiro. Para locos que tinham mais de dois alelos, a análise foi realizada para todos os alelos, independente de sua frequência. Todos os possíveis pares de combinações de árvores foram considerados como um conjunto e foram acessados para uma das 5 classes de distância. A extensão das classes de distância foram selecionadas, equalizando o número total de cada conjunto de pares de comparações. Foram calculados os valores do índice I de Moran (Sokal e Oden, 1978) para cada uma das classes de distância, em cada loco e para a média dos locos pela expressão:

$$\hat{I} = n \sum_i \sum_j w_{ij} Z_i Z_j / w \sum_i Z_i^2,$$

em que: $w_{ij} = 1$ para todas as células i e j localizadas em uma classe de distância ($r, r + \Delta r$), e do contrário $w_{ij} = 0$; w é a soma de todos os pesos (contagem de todos os pares usados em todos os casos); e Z_i é o desvio da frequência

alélica da i -ésima célula da média. O valor esperado de $I = -1/(n-1)$ aproxima-se de zero para grandes n . Os valores estimados do índice I de Moran foram usados para testar a significância dos desvios dos valores esperados, $E(I) = -1/(n-1)$, sobre a hipótese de distribuição aleatória (Cliff e Ord, 1981). A significância total de cada correlograma foi testada usando critérios de Bonferroni (Sakai e Oden, 1983). A análise de autocorrelação espacial e os testes foram realizados utilizando-se o programa SAAP (versão 4.3) de D. Wartenberg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas das frequências alélicas para 14 locos isoenzimáticos em duas populações de *O. odorifera*, localizadas em dois fragmentos (MCF e MA), são apresentadas na Tabela 2. Dos quatorze locos revelados, três apresentaram apenas um alelo (6Pgdh2, 6Pgdh3 e G6pdh1) e 11 segregaram de dois a quatro alelos (Est1, Est2 e Nad1). Em ambas as populações foram detectados 33 alelos, porém, quatro alelos raros ($p < 0,05$) eram exclusivos às populações. A população MCF apresentou o alelo 2 no loco Mdh1 e alelo 4 no loco Nad1, os quais estavam ausentes na população MA. Esta última, por sua vez, apresentou o alelo 3 no loco Dia2 e o alelo 4 no loco Est2 que estavam ausentes na população MCF. Alguns locos também apresentaram diferenças marcantes nas frequências alélicas entre populações, como os locos 6Pgdh1, Mdh2, Est1, Est2, Pgi2 e Nad1. Contudo, os alelos mais frequentes em uma população tenderam a ser igualmente mais frequentes na outra. A presença de alelos exclusivos nas populações e as diferenças nas frequências alélicas entre as populações sugerem que o fluxo gênico é restrito e há presença de deriva genética. A deriva pode estar associada ao tamanho amostral adotado na população MCF (26 genótipos) e, ao processo de fragmentação da população MA.

Tabela 2

 Freqüências alélicas em duas populações de *O. odorifera*.
 (Allelic frequencies in two *O. odorifera* populations)

Loco/alelo	Pop. MCF				Pop. MA			
	1	2	3	4	1	2	3	4
6Pgdh1	0,327	0,673	-	-	0,192	0,808	-	-
6Pgdh2	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
6Pgdh3	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
Dia1	0,423	0,577	-	-	0,500	0,500	-	-
Dia2	0,404	0,596	-	-	0,463	0,519	0,019	-
Mdh1	0,981	0,019	-	-	1,000	-	-	-
Mdh2	0,846	0,096	0,058	-	0,963	0,019	0,019	-
Est1	0,120	0,380	0,440	0,060	0,179	0,643	0,143	0,036
Est2	0,404	0,462	0,135	-	0,125	0,604	0,250	0,021
Pgi1	0,385	0,500	0,115	-	0,208	0,688	0,104	-
Pgi2	0,423	0,404	0,173	-	0,604	0,480	0,120	-
Nad1	0,385	0,404	0,192	0,019	0,604	0,354	0,042	-
G6pdh1	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
G6pdh2	0,538	0,462	-	-	0,593	0,407	-	-

Tabela 3

 Estimativas de índices de fixação, divergência genética e fluxo gênico entre populações em *O. odorifera*.
 (Fixation indexes, genetic divergence between populations and gene flow among populations, in *O. odorifera*)

Loco	\hat{f}	\hat{F}	\hat{q}_p	$\hat{N}m$
6Pgdh1	0,250	0,267	0,023	2,71
Dia1	-0,242	-0,245	-0,002	∞
Dia2	-0,497	-0,497	0,001	212,52
Mdh1	-0,001	0,001	0,001	84,40
Mdh2	0,020	0,059	0,040	1,49
Est1	0,050	0,137	0,091	0,62
Est2	0,500	0,530	0,059	0,99
Pgi1	0,157	0,188	0,036	1,66
Pgi2	-0,426	-0,432	-0,004	∞
Nad1	0,059	0,096	0,039	1,53
G6pdh2	0,324	0,311	-0,019	∞
Média	0,016	0,044	0,028	2,14
	(-0,194 a 0,220)	(-0,177 a 0,248)	(0,006 a 0,052)	(1,14 a 10,35)

 () Intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi estimado a partir de 10.000 reamostragens *bootstrap*.

 \hat{f} = índice de fixação para a média das populações;
 \hat{F} = índice de fixação para o total das população;
 \hat{q}_p = divergência genética entre população; $\hat{N}m$ = fluxo gênico entre populações.

Apesar da presença de alelos exclusivos e das diferenças aparentes nas freqüências alélicas entre as populações, a divergência genética (\hat{q}_p) entre as duas populações (Tabela 3) foi baixa para a média dos locos, mas significativa, mostrando que apenas 2,8% da diversidade genética encontra-se entre as populações e 97,2% dentro das populações. Em concordância, a estimativa do fluxo gênico aparente, a partir da divergência genética entre populações, indica que esse é alto entre as populações ($\hat{N}m > 1$), e elas não estão isoladas.

O índice de fixação médio dentro das populações (\hat{f}) e o total das populações (\hat{F}) foram baixos e não estatisticamente diferentes de zero, indicando ausência de endogamia e que as populações encontram-se nas proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Foram detectados altos níveis de diversidade genética dentro das populações (Tabela 4). O número médio de alelos por loco ($\hat{A} = 2,36$), a porcentagem de locos polimórficos a

95% de probabilidade ($\hat{P}_{95\%} = 67,8\%$) e a diversidade gênica esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e), estimados nas populações de *O. odorifera* foram muito superiores aos relatados por Hamrick e Godt (1989) para a média das espécies arbóreas ($\hat{A} = 2,19$; $\hat{P}_{95\%} = 64,7\%$; $\hat{H}_e = 0,177$, respectivamente) e média de espécies com distribuição ampla (2,29, 58,4% e 0,202, respectivamente). Os altos valores observados podem estar associados à ampla distribuição geográfica da espécie e ao seu sistema de reprodução, possivelmente, de cruzamento.

Foram observadas diferenças entre as populações para os índices $\hat{P}_{95\%}$, \hat{H}_o e \hat{H}_e , sendo que a menor população (MA) apresentou os maiores valores. Por outro lado, a estimativa do índice de fixação (\hat{F}) na população MA mostrou um pequeno excesso de homozigotos (3,5%), enquanto que a maior população (MCF), apresentou um pequeno excesso de heterozigotos (2,8%), porém nenhum dos casos era estatisticamente diferente de zero. Valores de $\hat{F} = 0$ indicam ajuste das frequências genotípicas às proporções do modelo de EHW, como já foi descrito pela análise de distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações. O ajuste dos dados ao modelo de EHW, a alta heterozigosidade observada e os

baixos níveis de fixação de alelos nas populações, sugerem que a espécie é de cruzamento, visto que espécies de autofecundação têm a maioria de seus locos em homozigose, portanto, têm baixos valores para o índice \hat{H}_o e alto para o índice \hat{F} .

A estimativa do coeficiente médio de coancestria dentro das populações (\hat{q}) foi de 0,029 na maior população (MCF) e 0,098 na menor (MA), mas nenhum valor foi significativamente diferente de zero. A coancestria na população MA pode ser considerada alta e se encontra entre o esperado em primos de primeiro grau (0,065) e meios-irmãos (0,125). A não significância estatística para este valor pode estar associada ao pequeno número de indivíduos na população. A estimativa da coancestria média dentro das populações 0,063 foi também próxima ao esperado entre primos de primeiro grau. A coancestria reduz o tamanho efetivo, aumenta a endogamia nas progênies e a correlação de parentesco dentro de progênies, acima dos esperado simplesmente pelo acaso (meios-irmãos). Em concordância, o tamanho efetivo (\hat{N}_e) e a relação entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral (\hat{N}_e/n) foi menor na população MA, que apresentava indícios de excesso de homozigotos e maior coancestria intrapopulacional.

Tabela 4

Índices de diversidade genética em indivíduos adultos de populações de *O. odorifera*.
(Diversity indexes in adults individuals of *O. odorifera* populations)

Pop.	n	\hat{A}	$\hat{P}_{95\%}$	\hat{H}_o	\hat{H}_e	\hat{F}	\hat{q}	\hat{N}_e	\hat{N}_e/n
MCF	26	2,36	64,3	0,341	0,332	-0,028 ^{ns}	0,029 ^{ns}	26,7	1,03
MA	26	2,36	71,4	0,375	0,388	0,035 ^{ns}	0,098 ^{ns}	25,1	0,97
Média	26	2,36	67,8	0,358	0,360	0,006 ^{ns}	0,063	26,45	1,00

^{ns}: não significativo; **: $P < 0,01$; A significância dos parâmetros foi estimada pelo do intervalo de confiança a 95% de probabilidade, a partir de 10.000 reamostragens bootstrap. \hat{A} = número médio de alelos por locos; $\hat{P}_{95\%}$ = porcentagem de locos polimórficos a 95% de probabilidade; \hat{H}_o = heterozigosidade observada; \hat{H}_e = diversidade gênica esperada; \hat{F} = índice de fixação; \hat{q} = coeficiente de coancestria; \hat{N}_e = tamanho efetivo.

A maior coancestria dentro da menor população pode ser explicada pelo pequeno número de indivíduos constituintes da população. De acordo com a distribuição diamétrica das árvores nas populações (Figuras 1 e 2), observa-se que ambas as populações, aparentemente, encontram-se em expansão, tendo muitos indivíduos jovem e poucos adultos, os quais, provavelmente, são os pais dos jovens. A população MCF apresenta distribuição aproximadamente normal (Figura 1), com maior número de indivíduos nas classes diamétricas intermediárias (5 cm a 20 cm), além de maior número de indivíduos nas classes de maior DAP. A população MA é pequena e parece estar em franca expansão, apresentando uma distribuição em forma de J invertido, constituída principalmente por indivíduos jovem (DAP \leq 10 cm), filhos prováveis dos poucos indivíduos adultos remanescentes na população. Em ambas, o número de indivíduos adultos ($>$ 20 cm de DAP) é baixo, porém, na maior população (MCF) este número é superior, o que permite um maior número de recombinações. Isto poderia explicar o menor coeficiente de coancestria na população MCF e menor na população MA.

A determinação do tamanho das populações (N) por inventário sugere que este número deva estar em torno de 120 na maior população (MCF) e de 30 na menor população (MA). Multiplicando a relação \hat{N}_e/n por estes números, chega-se aos tamanhos efetivos de 123,6 e 29,1, para as populações MCF e MA, respectivamente. O valor de \hat{N}_e para a população MCF está acima do determinado por Frankel e Soulé (1981) como suficientes para a conservação genética de uma população no curto prazo (50) e para que não ocorra a perda de variabilidade genética em até 10 gerações, em locos com dois alelos, em espécies sem sobreposição de gerações. Por outro lado, o \hat{N}_e estimado para a população MA está abaixo do mínimo requerido para a conservação genética. Substituindo-se o tamanho efetivo e a heterozigidade observada estimados em cada população na expressão $\hat{H}_t = [1 - 1/(2\hat{N}_e)]^t \hat{H}_0$ (Crow e Kimura,

1970), que prediz a perda de diversidade genética exclusivamente por deriva genética, em locos neutros de organismos diplóides com gerações discretas, espera-se que a heterozigidade da presente geração reduza de 0,341 para 0,327 na população MCF (4,0%) e de 0,375 para 0,315 na população MA (16%), em 10 gerações (t). Contudo, para uma predição mais acurada da perda de diversidade genética é necessário avaliar o sistema de reprodução das populações, o que até o momento é desconhecido para a espécie.

Os resultados das estimativas do Índice I de Moran para as populações são apresentadas nas Tabelas 5 e 6 e Figura 2. Os resultados da estimativa do índice I de Moran mostram fracos indícios de estruturação genética espacial nas populações de *O. odorifera*. A população MCF apresenta dois valores positivos e significativos na primeira classe de distância (0 m a 35m), seis na segunda classe (35 m a 74m), três na terceira classe (74m a 135m) e um na quarta classe. Na classe quatro também foram observados quatro valores negativos e significativos e na classe cinco sete valores positivos e significativos. Este resultado mostra uma tendência à estruturação entre a distância de 35 a 74m e aleatoriedade nas demais. Na classe de distância dois, a média do índice I de Moran foi positiva mas não significativo (0,05) (Figura 2). O correlograma total dos alelos, obtido pelo correção de Bonferroni, foi significativo em 29,2% dos casos, o que reforça a hipótese de possível estruturação espacial na população, mesmo que fraca.

Na população MA os resultados mostraram à tendência à maior aleatoriedade da distribuição espacial dos genótipos (Tabela 6). Foram detectados dois valores positivos e significativos na classe um (0 m a 22m), um na classe dois (22 m a 43m), três (43 m a 67m) e quatro (67 m a 159m). Na classe três e quatro também foram observados um valor negativo e significativo e na classe cinco dois valores negativos e significativos. Os valores médios do índice I de Moran foram negativos e não significativos,

sugerindo igualmente à ausência de estruturação. O correlograma total dos alelos não foi significativo para nenhum dos alelos, confirmando esta tendência. Assim, a maior população (MCF) apresenta a tendência à estruturação genética espacial na classe de distância dois, enquanto que a menor população (MA) mostrou tendência à distribuição aleatória dos genótipos.

A análise de distribuição das frequências alélicas entre populações mostrou baixa diferenciação, apesar da presença de alelos exclusivos nas populações. Considerando a longevidade da espécie e o fato que o processo de fragmentação é recente, pode-se esperar no futuro um aumento na divergência entre essas populações, caso o tamanho populacional não

seja ampliado. A detecção de coancestria dentro das populações pode ser um indicativo de que o processo de deriva está em fase de expansão. Com base nos resultados presentes é possível fazer-se duas recomendações para a conservação genética *in situ* dessas populações. Primeiro, recomenda-se o aumento do tamanho da populações MA de 30 para aproximadamente 150 indivíduos, com material proveniente de outras populações da mesma regiões. Segundo, formação de um corredor de fluxo gênico entre os fragmentos ou a formação de pequenas populações ou ilhas (aproximadamente 150 plantas) entre os mesmos, a fim de se manter as populações coesas em termos de fluxo gênico.

Tabela 5

Correlograma para o índice I de Moran para 5 classes de distâncias na população Mata da Cabine de Força (MCF), em *O. odorifera*.

(Moran I index correlogram for five distance class in *O. odorifera* Force Cabin Forest (MCF))

N. par.	Classes de distância					P
	0m a 35m	35m a 74m	74m a 135m	135m a 197m	197m a 267m	
6Pg d11	-0,16	-0,04	0,01	-0,02	0,01	0,644
Dia11	-0,05	-0,08	-0,18	0,10	0,00	0,346
Dia21	-0,09	0,16*	-0,04	-0,07	-0,16	0,150
Mdh21	-0,07	-0,04	-0,07	-0,02	-0,00	1,000
Mdh22	-0,04	0,02	-0,07	-0,12	0,01	1,000
Mdh23	-0,03	-0,07	-0,13	0,17*	-0,15	0,073
Est11	-0,19	0,02	-0,04	0,02	-0,01	0,296
Est12	0,04	0,17*	-0,04	0,01	-0,37**	0,001
Est13	0,27**	0,01	-0,01	-0,17	-0,30**	0,006
Est14	-0,05	-0,06	-0,02	0,07	-0,12	0,321
Est21	0,30**	0,50**	0,10	-0,48**	-0,62**	0,000
Est22	0,06	0,17*	-0,04	-0,27*	-0,13	0,099
Est23	0,05	0,06	0,03	-0,10	-0,24*	0,074
Pgi11	-0,02	0,19*	0,12*	-0,32**	-0,17	0,027
Pgi12	-0,06	0,09	0,20**	-0,23*	-0,20*	0,030
Pgi13	-0,06	0,11	-0,19	-0,09	0,03	0,303
Pgi21	0,07	0,05	-0,05	-0,02	-0,25*	0,068
Pgi22	-0,13	-0,01	-0,09	0,05	-0,02	0,916
Pgi23	0,08	0,22**	-0,04	-0,11	-0,34**	0,005
Nad11	-0,16	-0,07	0,01	0,04	-0,02	0,628
Nad12	-0,12	0,00	-0,09	0,05	-0,04	1,000
Nad13	-0,12	0,05	0,01	-0,05	-0,09	1,000
Nad14	-0,10	-0,02	-0,01	-0,01	-0,06	0,456
G6p21	0,02	-0,30**	0,13*	-0,05	0,01	0,037
Média	-0,02	0,05	-0,02	-0,07	-0,13	

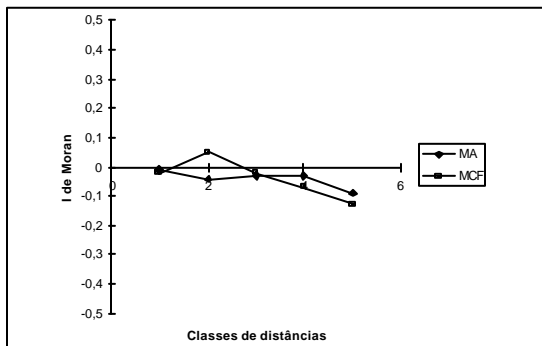
P: Significância total do correlograma (aproximação de Bomferroni); **: P<0,01; * P<0,05.

Tabela 6

Correlograma para o índice *I* de Moran para cinco classes de distâncias na população Mata do Aeroporto (MA), em *O. odorifera*.
(Moran *I* index correlogram for five distance class in *O. odorifera*, Airport Forest (MA))

N. par.	Classes de distância					P
	0m a 22m	22m a 43m	43m a 67m	67m a 159m	159m a 239m	
6Pg d11	0,06	-0,08	-0,02	-0,11	-0,05	0,847
Dia11	-0,07	-0,13	0,07	0,00	-0,07	0,743
Dia21	-0,05	-0,07	-0,05	-0,04	0,01	1,000
Dia22	-0,09	-0,09	-0,00	-0,01	0,01	1,000
Dia23	-0,02	-0,07	-0,07	-0,01	-0,02	1,000
Mdh21	-0,10	-0,02	0,03	-0,07	-0,05	0,962
Mdh22	-0,10	-0,04	-0,01	-0,02	-0,02	0,278
Mdh23	-0,10	-0,04	-0,01	-0,02	-0,02	0,278
Est11	0,01	-0,05	-0,04	-0,01	-0,10	1,000
Est12	0,39**	0,21**	-0,16	-0,17	-0,47**	0,000
Est13	0,06	-0,12	0,04	-0,07	-0,11	0,750
Est14	-0,09	-0,07	-0,02	0,01	-0,02	0,581
Est21	-0,04	0,01	-0,21*	0,13*	-0,08	0,143
Est22	0,06	-0,08	-0,00	0,03	-0,20*	0,092
Est23	-0,11	-0,12	0,08	-0,00	-0,05	0,547
Est24	0,04*	0,01	0,02	-0,10	-0,17	0,116
Pgi11	0,11	-0,16	0,09	-0,22*	-0,01	0,102
Pgi12	0,10	0,09	0,06	-0,05	-0,40**	0,000
Pgi13	-0,10	-0,11	0,11*	-0,08	-0,02	0,233
Pgi21	-0,11	0,00	-0,04	0,06	-0,12	0,674
Pgi22	-0,08	0,04	-0,13	0,01	-0,04	0,881
Pgi23	0,05	-0,11	-0,10	-0,03	-0,01	1,000
Nad11	-0,09	-0,02	0,01	-0,02	-0,08	1,000
Nad12	-0,02	-0,08	-0,09	0,05	-0,06	0,783
Nad13	-0,13	-0,03	-0,03	-0,02	0,02	0,681
G6p21	0,02	0,03	-0,17	-0,08	0,00	0,527
Média	-0,01	-0,04	-0,03	-0,03	-0,09	

P: Significância total do correlograma (aproximação de Bomferroni); **: P<0,01; * P<0,05.


Figura 3

Correlograma para o índice *I* de Moran para o método do vizinho mais próximo por classes de distância na população Cabine de Força (MCA) e Aeroporto (MA), em *O. odorifera*.

CONCLUSÕES

- ✓ Foram detectados baixos níveis de divergência genética entre populações;
- ✓ A espécie *O. odorifera* apresenta altos índices de diversidade genética em comparação à média das espécies arbóreas tropicais;
- ✓ A magnitude dos índices de diversidade heterosigozidade observada e índice de fixação observados em *Ocotea odorifera* são característicos de espécies alógamas ou de sistema misto com predomínio de cruzamentos;
- ✓ Foram detectados indícios de estruturação genética espacial na maior população, MCF;

✓ As duas populações de *O. odorifera* avaliadas têm diversidade genética potencial para a conservação *in situ*.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

PAULO YOSHIO KAGEYAMA é Professor Adjunto do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ / USP - Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: kageyama@esalq.usp.br

GIRLEI COSTA DA CUNHA é Engenheiro Florestal pela ESALQ / USP

KLAUS DUARTE BARRETO é Engenheiro Florestal pela ESALQ / USP

FLÁVIO BERTIN GANDARA é Professor Assistente do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ / USP - Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: fgandara@esalq.usp.br

FAUSTO RODRIGUES ALVES CAMARGO é Engenheiro Florestal da VCP - Votorantim Celulose e Papel S.A. - Caixa Postal 94 - Setor Florestal - 12300-000 - Jacareí, SP - E-mail: faustorac@vcp.com.br

ALEXANDRE MAGNO SEBBENN é Pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo - Estação Experimental de Tupi - Caixa Postal 339 - 13400-970 - Piracicaba, SP - E-mail: amsebbenn@bol.com.br

Os autores agradecem à VCP - Votorantim Celulose e Papel S.A. pelo suporte financeiro do trabalho. Os autores agradecem também à técnica de laboratório Maria Andréia Moreno pela eletroforese de isoenzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.A. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Curitiba: EMBRAPA / CNPF, 1994. 640p.
- CLAYTON, J.; TRETIK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of fisheries research board Canadian**, v.29, p.1169-1172, 1972.
- CLIFF, A.D.; ORD, J.K. **Spatial processes methods and applications**. London: Pion, 1981. 389p.
- COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, v.47, n.3, p.855-863, 1993.
- CROW, J. F.; AOKI, K. Groupselection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.81, p.6073-6077, 1984.
- CROW, J.F.; KIMURA, M.A. **An introduction to population genetics theory**. London: Harper & Row, 1970. 591p.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa identifica pimenta que produz safrol. **Boletim semanal de divulgação científica**, v.6, p.1-4, 1998.
- FAPESP - FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Otto Gottlieb, o brasileiro indicado para o prêmio Nobel de Química. **Notícias FAPESP**, n.43, jun. 1999. (<http://www.fapesp.br/politciotec43.htm>)
- FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.
- FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. **Flora ameaçada de Minas Gerais**. (<http://www.biodiversitas.org/floramg/form.flora.asp>)
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H. D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1989. p.43-63.
- KLEIN, R.M. Espécies raras ou ameaçadas de extinção em Santa Catarina. **Estudos de biologia**, v.31, p.3-9, 1993.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data, version 1.0 for Windows 3.1**. 1999. (<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>)
- LI, C.C. **First course in population genetics**. San Francisco: The Boxwood Press, 1976. 631p.
- QUELLER, D.C.; GOODNIGHT, K.F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v.43, p.264-275, 1989.

- SAKAI, A.K.; ODEN, N.L. Spatial pattern of sex expression in silver maple (*Acer saccharium* L.): Morista's index and spatial autocorrelation. **American naturalist**, v.122, p.489-508, 1983.
- SILVA, J.M.O.D.; OLTRAMARI, A.C.; MARASCHIN, M.; PEROTTI, E.L. Aspectos biotecnológicos da canela sassafrás. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, n.20, p.44-48, 2001.
- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. Spatial autocorrelation in biology: 1- methodology. **Biological journal of the Linneum Society**, v.10, p.199-228, 1978.
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. BIOSYS-1: a Fortran computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. **Journal of heredity**, v.72, p.282-283, 1989.
- VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. Reprinted from: **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. 528p.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: 2- methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.
- WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S., ed. **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. p.5-45.