

TIAGO LUIZ DAROS

**SISTEMA REPRODUTIVO E ESTRUTURA GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE  
IMBUIA (*Ocotea porosa* (NEES & MART.) BARROSO – LAURACEAE).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, área de concentração: Taxonomia e biologia de fanerógamas, pteridófitas e líquens, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Renato Goldenberg

Co-Orientadora: Dra. Valderês Aparecida de Sousa

CURITIBA

2006

## AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo apoio fornecido em todos os momentos.

A Dra. Valderês Aparecida de Sousa, pela amizade e grande profissionalismo demonstrado em todos os momentos, valiosos a minha vida.

Ao Dr. Renato Goldenberg, pela orientação e oportunidade de desenvolvimento do trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Gizelda Maia Rego e Dr. Antonio Nascim Kalil Filho pelo apoio fornecido em todo o projeto.

A *Embrapa Florestas*, pelo uso de suas dependências, equipamentos e reagentes utilizados na realização do trabalho.

A Dra. Simone Neumann Wendt, pela ajuda fornecida nas análises de dados e contribuição ao trabalho, além da grande amizade, companheirismo e paciência.

Ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn, pela colaboração nas análises genéticas.

Ao Dr. Osmir José Lavoranti, pela ajuda estatística fornecida.

A Universidade Federal do Paraná, especialmente aos professores e funcionários do Departamento de Botânica.

Aos funcionários da *Embrapa Florestas* que ajudaram no desenvolvimento do trabalho: Maria, Zé Elias, Carlinhos, Nivaldo, Diomar, Odacilo, Viro, Arnaldo Soares, Kodama, Amauri, Décio, Jonatas e Marcela.

A Maria Lúcia, pela ajuda na aquisição de equipamentos e produtos.

Aos amigos do curso de Pós-graduação: Ana Cristina, Michella, Igor, Fernanda, Rodrigo, Priscila, Juliany, Ari, Letícia, Renata, Cris Piccinini e Ciane.

A todos do Laboratório de Genética e Pólen, pelo companheirismo e momentos de descontração: Felipe, Mário, Carla, Antonio, André, Ygor, Leonardo e Alexandre.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo no segundo ano.

A todos que compartilharam os momentos felizes e os “não tão felizes”, especialmente ao Alberto pelo grande apoio fornecido.

Agradeço a todos, embora não citados, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A vocês, muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO I. MARCADORES ISOENZIMÁTICOS, ANÁLISE DE HERANÇA E LIGAÇÃO DOS LOCOS EM <i>Ocotea porosa</i> (NEES &amp; MART.) BARROSO (LAURACEAE)</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 Amostragem dos indivíduos, coleta e transporte de amostras .....	13
2.2 Procedimento de eletroforese de isoenzimas .....	13
2.3 Interpretação de zimogramas .....	16
2.4 Análise de dados .....	16
2.4.1 Análise de segregação.....	16
2.4.2 Análise de desequilíbrio de ligação .....	17
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>18</b>
3.1 Eletroforese de isoenzimas .....	18
3.1.2 Padrões das isoenzimas.....	20
3.1.2.1 Locos monomórficos .....	20
3.1.2.2 Locos polimórficos .....	21
3.1.3 Definição dos sistemas enzimáticos para <i>O. porosa</i> .....	23
3.2 Análise de segregação.....	25
3.3 Análise de desequilíbrio de ligação .....	28
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>30</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO II. VARIAÇÃO, ESTRUTURA GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Ocotea porosa</i> (NEES &amp; MART.) BARROSO (LAURACEAE)</b> .....	<b>36</b>

<b>RESUMO .....</b>	<b>37</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>38</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 Material .....	41
2.1.1 Caracterização do local de estudo.....	41
2.2 Métodos .....	41
2.2.1 Análise isoenzimática .....	41
2.2.1.1 Amostragem dos indivíduos, coleta e transporte de amostras .....	41
2.2.1.2 Procedimento de eletroforese de isoenzimas .....	42
2.2.1.3 Caracterização da estrutura e variação genética .....	42
2.2.1.3.1 Medidas de parâmetros genéticos básicos .....	42
2.2.1.3.2 Medidas de estrutura e variação genética intrapopulacional.....	43
2.2.1.3.3. Medidas de estrutura e variação genética entre progênies .....	44
2.2.2 Sistema reprodutivo .....	46
2.2.2.1 Verificação da receptividade estigmática e viabilidade do pólen .....	46
2.2.2.2 Polinizações controladas.....	46
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
3.1 Parâmetros genéticos .....	48
3.1.1 Estrutura genética .....	48
3.1.2 Variação genética.....	49
3.1.3 Diversidade genética.....	50
3.1.4 Diferenciação entre progênies.....	51
3.2 Sistema reprodutivo .....	54
3.2.1 Viabilidade polínica e receptividade do estigma .....	54
3.2.2 Polinizações controladas.....	55
3.3 Germinação de sementes das progênies da procedência de Colombo - PR.....	56
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO I. MARCADORES ISOENZIMÁTICOS, ANÁLISE DE HERANÇA E LIGAÇÃO DOS LOCOS EM *Ocotea porosa* (NEES & MART) BARROSO (LAURACEAE).....9**

FIGURA 1. Representação esquemática dos fenótipos observados, representados por números, nos zimogramas de *O. porosa* para os sistemas GOT, 6-PGDH, PGM e MDH. Alelos rachurados encontram-se nas zonas monomórficas e alelos em preto indicam as zonas analisadas.....24

### **CAPÍTULO II. VARIAÇÃO, ESTRUTURA GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE *Ocotea porosa* (NEES & MART.) BARROSO (LAURACEAE) ..... 36**

FIGURA 1: Diferenciação alélica ( $D_j$ ) entre os sistemas utilizados nas progênes de *O. porosa* representadas pelos diagramas em caracol. Os comprimentos dos raios indicam  $D_j$  e o raio do círculo é igual a  $\delta$  (diferenciação total).....53

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I. MARCADORES ISOENZIMÁTICOS, ANÁLISE DE HERANÇA E LIGAÇÃO DOS LOCOS EM <i>Ocotea porosa</i> (NEES &amp; MART) BARROSO (LAURACEAE).....</b>	<b>9</b>
TABELA 1: Sistemas enzimáticos testados em <i>Ocotea porosa</i> .....	14
TABELA 2: Sistemas de gel-eletrodo investigados para o estabelecimento do protocolo de isoenzimas de <i>O. porosa</i> .....	15
TABELA 3: Composição química dos sistemas utilizados para o estabelecimento do protocolo de isoenzimas de <i>O. porosa</i> .....	15
TABELA 4. Concentrações de sacarose e penetrose testados no sistema Tris-Citrato.....	16
TABELA 5: Resolução e atividade em relação aos sistemas enzimáticos e tampões de gel/eletrodo empregados em <i>O. porosa</i> .....	19
TABELA 6: Polimorfismo em relação aos sistemas enzimáticos e tampões de gel/eletrodo utilizados em <i>O. porosa</i> .....	19
TABELA 7. Teste para hipótese de segregação regular ( <i>G</i> ) de marcadores isoenzimáticos em <i>O. porosa</i> .....	27
TABELA 8. Árvores de <i>O. porosa</i> com desvios de segregação da razão esperada 1:1, para o loco enzimático 6-PGDH-A.....	27
TABELA 9. Medida composta de Burrows para o desequilíbrio gamético ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ) e testes de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para a hipótese de segregação independente nas combinações dos locos isoenzimáticos utilizados em <i>O. porosa</i> .....	28
<b>CAPÍTULO II. VARIAÇÃO, ESTRUTURA GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Ocotea porosa</i> (NEES &amp; MART.) BARROSO (LAURACEAE).....</b>	<b>36</b>
TABELA 1: Freqüências alélicas e teste de $\chi^2$ para a população e progênies de <i>O. porosa</i> de Colombo – PR, correspondentes aos locos analisados.....	48
TABELA 2: Freqüência de heterozigotos observados e teste de $\chi^2$ para os desvios das freqüências para a população bem como para as progênies de <i>O. porosa</i> analisadas da procedência de Colombo – PR.....	50
TABELA 3: Diversidade alélica na população de <i>O. porosa</i> localizada em Colombo – PR.....	50
TABELA 4: Estatística-F para os três locos isoenzimáticos utilizados na análise de progênies de <i>O. porosa</i> .....	51

TABELA 5: Diferenciação alélica ( $D_j$ ) e diferenciação alélica média ( $\delta$ ) nas progênes de <i>O. porosa</i> .....	52
TABELA 6: Porcentagem da viabilidade de pólen obtida através do uso de corante tetrazólio por árvore analisada de <i>O. porosa</i> .....	54
TABELA 7: Polinizações controladas realizadas em <i>O. porosa</i> no ano de 2004 e número de flores testadas (NFL), número de frutos originados (NFR) e porcentagem por tratamento.....	55
TABELA 8: Resultados dos cruzamentos controlados efetuados em <i>O. porosa</i> em 2004, com o número de flores testadas (NFL), número de frutos originados (NFR) e porcentagem por árvore. Eixos: vertical - árvores receptoras de pólen; horizontal – árvores doadoras de pólen.....	55
TABELA 9: Polinizações controladas realizadas em <i>O. porosa</i> no ano de 2005 e número de flores testadas (NFL), número de frutos originados (NFR), após o período de 1 mês (NFR1), 2 meses (NFR2), 3 meses (NFR3) após polinizações e porcentagem de frutos originados por tratamento.....	55
TABELA 10: Porcentagem de indivíduos albinos encontrados nas progênes de <i>O. porosa</i> da procedência de Colombo – PR.....	56

## RESUMO

Foram testados vinte sistemas enzimáticos e seis sistemas de gel-eletrodo para a caracterização genética de *Ocotea porosa* através de marcadores isoenzimáticos. Análizou-se os padrões de variação genética em uma população fragmentada e suas progênies. Foram realizados testes para avaliação do sistema reprodutivo através de polinização controlada, e verificou-se também a viabilidade do pólen e a receptividade estigmática da espécie. Quatro sistemas polimórficos revelaram quatro locos e nove alelos. A relação de ligação entre locos foi estudada pela medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows. Não houve indícios de ligação entre os quatro locos analisados. Baixas frequências alélicas foram observadas em indivíduos adultos e progênies. Houve excesso de homozigotos nas progênies e maior variabilidade alélica dentro das progênies. Nas polinizações controladas foram originados frutos somente nos tratamentos de autopolinização, polinização livre e cruzada, indicando sistema misto de reprodução. Os dados sugerem que a população analisada pode apresentar efeitos decorrentes do processo de fragmentação florestal.



## **ABSTRACT**

Were tested twenty enzymatic systems and six gel-electrode systems, aiming the genetic characterization of *Ocotea porosa* through isozymatic markers. Genetic pattern of variation was investigated in a fragmented population of *Ocotea porosa* and in its progenies. Tests were performed for evaluation of the breeding system through controlled pollination, and the pollen viability and estigmatic receptivity was checked. Four polymorphic enzyme systems revealed four loci and nine alleles. The linkage relationship among loci was studied by the composed measure of linkage of Burrows. There was not evidence of linkage among the analyzed loci. Low allelic frequencies were observed for both adult individuals and progenies. A homozygous excess was observed in progenies and allelic variability was higher within progenies. Fruits were set from controlled self pollination, opened pollination and crossed controlled pollination, suggesting a mix mating system. The observed results suggest that the fragmentation process can be influencing this population.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### A espécie *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso

A espécie é também conhecida como imbuia ou embuia. É característica da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), de ocorrência natural nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (CARVALHO, 1994). Segundo o autor, a espécie pode formar populações densas, chamadas de “imbuiais”.

As árvores apresentam altura variando de 10 a 20 metros, com caule entre 50 e 150 cm de DAP (diâmetro a altura do peito). Na idade adulta, pode atingir até 30 m de altura e 320 cm ou mais de DAP (CARVALHO, 2003). O tronco é tortuoso, irregular, com fuste comumente curto. Sua ramificação é cimosa e dicotômica, com copa pouco densa e ampla, de folhas simples, oblongo-lanceoladas com disposição alterna.

Sua inflorescência é formada por pequenas flores hermafroditas de coloração branco-amareladas, com cálice revestido de pêlos dourados, dispostas em racemos simples axilares (CARVALHO, 2003).

O fruto é drupáceo, de superfície lisa lustrosa, de cor roxo-escuro tendendo para o azul, (HERTEL, 1974) unilocular, sendo a semente uma castanha com superfície lisa, com várias estrias (CARVALHO, 2003). As sementes de imbuia têm comportamento recalcitrante, dificultando assim o seu armazenamento. A dispersão de frutos e sementes é predominantemente zoocórica, realizada principalmente por mamíferos e aves (CARVALHO, 2003).

Segundo CARVALHO (2003), a floração ocorre no período de outubro a dezembro e a frutificação de fevereiro a abril. No entanto, LORENZI (1992), cita o florescimento e frutificação nos períodos de outubro a novembro e de janeiro a março, respectivamente.

*O. porosa* tem como sinonímia botânica *Oreodaphne porosa* Nees et Martius, *Phoebe porosa* (Nees & Martius) Mez e *Cinnamomum porosum* (Nees & Mart.) Kost. (para maiores detalhes ver BARROSO, 1949; OCCHIONI, 1956; KOSTERMANS, 1961; HERTEL, 1968; CARVALHO, 2003)

A imbuia sempre desempenhou papel fundamental no desenvolvimento econômico e cultural nas regiões de abrangência da Floresta Ombrófila Mista (CALDATO; LONGHI; FLOSS, 1999), pois apresenta ampla utilização. A qualidade estética da madeira é mundialmente apreciada, sendo exportada em grande quantidade para a fabricação de mobiliários de luxo (CARVALHO, 2003). É também usada na construção civil, em vigas, forros, tábuas e tacos para assoalhos, em portas, janelas e molduras, além da carpintaria e marcenaria. É empregada como planta ornamental e na arborização urbana, além de reflorestamento para a recuperação ambiental.

Esta espécie vem sofrendo grave erosão genética, principalmente devido ao desmatamento (CARVALHO, 2003), além da exploração para fins econômicos.

*O. porosa* encontra-se na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (IBAMA, 1992), e na Lista Vermelha do Paraná, categoria rara (SEMA, 1995). Por isso deve receber atenção especial quanto a conservação genética dos seus remanescentes.

## **Fragmentação Florestal**

A Floresta Ombrófila Mista foi alvo de intensa exploração pela indústria madeireira durante as últimas décadas, levando quase a exaustão de recursos naturais. Neste processo duas espécies valiosas foram muito visadas, a *Araucaria angustifolia*, ou pinheiro-do-Paraná, e *Ocotea porosa*, ou imbuia, restando atualmente apenas fragmentos dessa vegetação (CALDATO; LONGHI; FLOSS, 1999).

A fragmentação florestal tem efeito negativo sobre o ecossistema, que adquire aspectos ecológicos diferentes em relação ao ambiente original. A descontinuidade da distribuição da vegetação original reduz o habitat disponível às plantas e animais silvestres, podendo influenciar os padrões de biodiversidade, e afetar os padrões ecológicos de dispersão e migração (SOULÉ; KOLM, 1989).

YOUNG; BOYLE (2000) ressaltam três principais efeitos da fragmentação em relação às espécies: redução do número de indivíduos, do tamanho populacional pelo isolamento dos mesmos em fragmentos pequenos e o isolamento espacial de populações e indivíduos dentro de matrizes.

Com o isolamento reprodutivo, poderá ocorrer a redução no genótipo da população original e perda de alelos devido à deriva genética, caso a população remanescente continue isolada por várias gerações (SOUZA, 1997; KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998).

Para elaborar estratégias de conservação, manejo e recuperação de fragmentos florestais é imprescindível o conhecimento da ecologia e genética de populações, pois estes conceitos são importantes na orientação de ações e na definição de parâmetros adequados (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998).

## **Marcadores bioquímicos**

Dentre as técnicas empregadas para inferir os padrões de variabilidade genética em espécies arbóreas florestais encontram-se os marcadores genéticos bioquímicos, também conhecidos como isoenzimas.

As isoenzimas são múltiplas formas moleculares de uma enzima que ocorrem em um organismo e que desempenham a mesma atividade catalítica (MOSS, 1982). Diferentes formas moleculares de uma enzima, detectadas através de eletroforese, são decorrentes do resultado de diferenças entre os genes que codificam tal enzima (BERGMANN; HATTEMER, 1998).

Essas enzimas podem ser fracionadas, devido as suas características moleculares (carga elétrica, peso molecular e estrutura quaternária), em um meio suporte (gel de amido, por exemplo) através do processo de eletroforese. Após essa separação, as mesmas são identificadas por reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Após as reações, há o surgimento de produtos coloridos (bandas) que permitem identificar a sua posição no gel (ALFENAS, 1998).

Dentre as diversas vantagens destes marcadores, destacam-se a expressão codominante, que permite diferenciar o genótipo homocigoto do heterocigoto, e apresenta custo relativamente baixo (BERGMANN; HATTEMER, 1998). Também destacam-se outras vantagens, como rápida execução para estudos genéticos populacionais (PÓVOA, 2002), herança mendeliana, ausência de epistasia e pleiotropia (WENDEL; WEEDEN, 1989).

### **Variabilidade genética**

Estudos de estrutura genética em populações naturais buscam descrever os níveis e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações.

A distribuição da variabilidade genética em populações naturais é influenciada principalmente pelo modo de reprodução, sistemas de cruzamento, tamanho efetivo da população, fluxo gênico e distribuição geográfica, sendo estruturada no tempo e espaço (HAMRICK, 1983). A distribuição dessa variabilidade é resultante da interação de diversos fatores evolutivos, tais como mutação, migração, seleção e deriva genética.

A caracterização da variabilidade genética de populações é efetuada a partir de medidas de diversidade intrapopulacionais, como a porcentagem de locos polimórficos e seu número médio de alelos, a média de alelos observados e as taxas de heterozigosidade (esperada e observada).

Diversos parâmetros genéticos podem ser estimados com o uso de marcadores moleculares e bioquímicos, destacando-se o conhecimento do sistema de reprodução, da variabilidade e da estrutura genética de populações. Esse conhecimento é importante para o delineamento de estratégias em programas de melhoramento e conservação genética de espécies arbóreas (SEOANE; SEBBENN, 2004).

### **Sistema reprodutivo em espécies arbóreas**

O sistema reprodutivo é determinante na distribuição da variabilidade genética de populações, além da forma de fluxo gênico (forma de cruzamento e síndrome de dispersão do pólen e semente) (SEOANE; SEBBENN; KAGEYAMA, 2000). Tais fatores permitem explicar o comportamento dos alelos nas populações (WRIGHT, 1943).

Os sistemas de cruzamentos nas plantas com reprodução sexuada variam desde a autogamia completa até a alogamia obrigatória. Em espécies hermafroditas, o sistema de reprodução é determinado por fatores genéticos, como grau de incompatibilidade, e fatores ecológicos, como hábito do polinizador, fenologia floral, aborto seletivo de frutos e densidade da população (MURAWSKI; HAMRICK, 1991).

Os estudos para a avaliação do sistema reprodutivo são geralmente realizados por meio de métodos tradicionais, envolvendo os estudos de biologia floral, ecologia de polinizadores e experimentos de polinização controlada. Mais recentemente o sistema de reprodução de espécies florestais arbóreas vem sendo conduzido com o uso de marcadores bioquímicos e moleculares.

Existem poucas informações sobre o sistema reprodutivo de espécies arbóreas tropicais. Todavia o conhecimento do modo de reprodução nessas espécies pode ser uma importante ferramenta sobre os padrões de cruzamentos, a dinâmica de processos microevolucionários e na definição de estratégias que visem o manejo florestal e a conservação dessas espécies (OLIVEIRA, CARVALHO, ROSADO, 2002).

## Viabilidade de pólen e receptividade estigmática

Os estudos de biologia reprodutiva nas espécies arbóreas envolvem principalmente estudos de viabilidade polínica, receptividade do estigma e sistema de reprodução (DAFNI, 1992). Estes estudos buscam conhecimento sobre o modo de reprodução, o qual é típico para cada espécie.

Os testes de viabilidade são importantes para verificar a potencialidade do grão de pólen. Esse conhecimento é importante em testes de polinização controlada, para se ter segurança do uso de pólen viável, visando a identificação de mecanismos como a incompatibilidade na formação de sementes (KEARNS; INOUE, 1993). Esses testes podem ser realizados através de dois métodos principais: *in vivo* e *in vitro*. No método de avaliação *in vivo* é analisada a capacidade do pólen germinar e fertilizar o óvulo após a sua deposição no estigma. Já os métodos *in vitro* podem ser realizados através de testes de germinação em meios apropriados e com o uso de corantes específicos.

A aplicação de corantes específicos é mais vantajosa do que os testes de germinação por ser mais prática e rápida (BOLAT; PIRLAK, 1999). Cada corante apresenta uma forma diferente de ação, e diferentes relações com a viabilidade real do pólen. Uma outra característica que não pode ser ignorada é a receptividade do estigma. O conhecimento do estágio ideal da receptividade é necessário para a deposição do pólen, pois há secreção de substâncias que estimulam sua germinação. Dentre estas secreções existem enzimas, as quais podem ser facilmente detectadas através de determinadas reações, como o teste com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que indica a receptividade através da formação de bolhas de ar, sendo um método simples e barato (MAUÉS; COUTURIER, 2002).

Entretanto a interação pólen-estigma é dependente de várias relações, tais como a viabilidade do pólen, receptividade do estigma e da interação genética em sistemas de incompatibilidade (DAFNI, 1992). Uma vez conhecida a viabilidade do pólen e o período exato de receptividade do estigma, através de polinizações controladas é possível fazer inferências sobre apomixia, sistemas de incompatibilidade e outros eventos importantes que influenciam o sistema reprodutivo da espécie.

## Contexto do trabalho

O presente trabalho visa fornecer informações sobre a caracterização genética e o sistema reprodutivo de *Ocotea porosa*, sendo subdividido em dois capítulos que contemplarão dois artigos a serem submetidos à publicação.

No capítulo I intitulado “Marcadores isoenzimáticos, análise de herança e ligação dos locos em *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso (Lauraceae)”, foram levantadas as seguintes questões: quais os possíveis sistemas isoenzimáticos a serem utilizados? Essas enzimas obedeceram o padrão de segregação mendeliana (1:1)? As enzimas selecionadas apresentaram desequilíbrio de ligação?

No capítulo II, “Variação, estrutura genética e sistema de reprodução de uma população de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso (Lauraceae)” foram questionados: houve diferença nos parâmetros genéticos entre população e progênie? como é o sistema reprodutivo da espécie inferido através de polinizações controladas? houveram diferenças na viabilidade do pólen das diferentes árvores testadas?

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a biologia reprodutiva e caracterizar geneticamente uma população natural de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso através de marcadores bioquímicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar protocolos para análise de isoenzimas;
- Identificar os locos isoenzimáticos de *O. porosa* para estudos genéticos;
- Verificar a herança e o desequilíbrio de ligação dos locos isoenzimáticos identificados;
- Caracterizar a variabilidade de uma população de *O. porosa* e suas progênes através de marcadores isoenzimáticos;
- Realizar polinizações controladas para analisar o sistema de reprodução em indivíduos de *O. porosa*;
- Verificar a viabilidade do grão de pólen de *O. porosa* através do uso de corante tetrazólio.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 1998. 574 p.

BARROSO, L. J. Chave para a determinação de gêneros indígenas e exóticos da família Lauraceae no Brasil. **Rodriguésia**, ano XII, n. 24, 1949.

BERGMANN, F.; HATTEMER, H. H. Isozymes in forest genetics research. In: MANDAL, A. K., GIBSON, G. L. (Ed.) **Forest Genetics and Tree Breeding.** New Dehli: CBS Publishers & Distributors, p. 227-238, 1998.

BOLAT, I.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 23, n. 4, p. 383-388, 1999.

CALDATO, S. L.; LONGHI, S. J.; FLOSS, P. A. Estrutura populacional de *Ocotea porosa* (Lauraceae) em uma floresta ombrófila mista, em Caçador (SC). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 89-101, 1999.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras.** Volume 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: Embrapa – CNPq; Brasília, DF: Embrapa – SPI, 1994. 640 p.

DAFNI, A. **Pollination ecology: A practical approach.** IRL Press: Oxford University Press, 1992. 250 p.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. **Genetics and Conservation.** Menlo Park California: Benjamin Cummings, p. 335-348, 1983.

HERTEL, R. J. G. Estudos sobre *Phoebe porosa* (Nees) Mez I. Nomenclatura da imbuia e alguns dos problemas que encerra. **Dusenía**, v. 8, n. 5, p. 166 – 194, 1968.

HERTEL, R. J. G. Estudos sobre *Phoebe porosa* (Nees) Mez II. A inflorescência, a flor e o fruto da imbuia. **Acta Biológica Paranaense**, v. 3, p. 25-53, 1974.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. Portaria Nº 37-N, de 3 de abril de 1992. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção.**

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

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists.** University Press of Colorado, 1993. 583 p.

KOSTERMANS, A. J. G. H. The New World species of *Cinnamomum* Trew (Lauraceae). **Reinwardtia**, v. 6 n.1, p. 17-24, 1961.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Volume 2. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MAUES, M. M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p.441-448, 2002.

MOSS, D. W. **Isoenzymes.** London & New York:Capman & Hall, 1982. 200 p.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v. 67, p 167-174, 1991.

OCCHIONI, P. Sobre a nomenclatura científica da imbuia – *Ocotea porosa* (Nees) L. Barroso. **Tribuna Farmacêutica**, n. 24, v. 10, p. 153-155, 1956.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. Na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

PÓVOA, J. S. R. Distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SEMA - Secretaria de Estado do Meio Ambiente. **Lista vermelha das plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná.** Curitiba: SEMA: GTZ, 1995.



SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, n. 57, p. 123-139, 2000.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M. Herança E desequilíbrio de ligação em locos de isoenzimas de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2004.

SOULÉ, M. E.; KOHN, K. A. **Research priorities for conservation biology**. Washington: Island, 1989.

SOUZA, L. M. F. I. Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hill (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

WENDELL, J. F.; WEEDEN, N. F. Visualization and interpretation of plant isozyme. IN: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.) *Isozymes in plant biology*. Portland: Dioscorides Press, p. 5-45, 1989.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**. Washington, v. 28, p. 114-138. 1943.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOYLE, T.; BOSHIER, D. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Melbourne, Australia: CSIRO Publishing, 2000.

**CAPÍTULO I. MARCADORES ISOENZIMÁTICOS, ANÁLISE DE HERANÇA E LIGAÇÃO  
DOS LOCOS EM *Ocotea porosa* (NEES & MART.) BARROSO (LAURACEAE)<sup>1</sup>**

**CHAPTER I. ISOZYME MARKERS, INHERITANCE ANALYSIS AND LINKAGE IN *Ocotea  
porosa* NEES & MART.) BARROSO (LAURACEAE)**

---

<sup>1</sup> Capítulo baseado nas normas da Revista do Instituto Florestal

**RESUMO**

Vinte sistemas enzimáticos e seis sistemas de gel-eletrodo foram testados para a caracterização genética de *Ocotea porosa* através de marcadores isoenzimáticos. Dados de quatro sistemas polimórficos (GOT, 6-PGDH, MDH e PGM) revelaram quatro locos e nove alelos. Desvios de segregação regular 1:1 foram observados no loco 6-PGDH em progênes de polinização aberta. A relação de ligação entre locos foi estudada pela medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows. Não houve indícios de ligação entre os quatro locos analisados.

Palavras-chave: *Ocotea porosa*, Lauraceae, isoenzimas, segregação mendeliana, locos gênicos, alelos.

**ABSTRACT**

Twenty enzymatic systems and six gel-electrode systems were tested, aiming the genetic characterization of *Ocotea porosa* through isozymatic markers. Data of four polymorphic enzyme systems (GOT, 6-PGDH, MDH and PGM) revealed four loci and nine alleles. Deviations of regular segregation 1:1 were observed in open pollination offsprings for the locus 6-PGDH. The linkage relationship among loci was studied by the composed measure of linkage of Burrows. There was not evidence of linkage among the analyzed loci.

Key-words: *Ocotea porosa*, Lauraceae, mendelian segregation, gene loci, allele.

## 1. INTRODUÇÃO

Os marcadores isoenzimáticos vêm sendo amplamente utilizados em estudos genéticos de espécies florestais, auxiliando programas de melhoramento e conservação genética (Oliveira *et al.*, 2002).

Entretanto, para que os mesmos sejam validados como marcadores genéticos, é necessário o conhecimento do modo de herança, bem como, o equilíbrio de ligação entre os locos (Gillet & Hattemer, 1989). Esta metodologia deve ser a primeira atividade de pesquisa realizada em um estudo de genética de populações antes de sua aplicação.

A ausência de ligação é um pressuposto básico em estudos de diversidade e estrutura genética, sistema reprodutivo e análise de paternidade, sendo pré-requisito para a exclusão de um dos locos que apresenta desequilíbrio de ligação. Quando ocorre o desequilíbrio de ligação a exclusão dos locos que apresentam desequilíbrio permite a quebra da associação alélica entre estes, de forma que possam ser usados em subseqüentes estudos genéticos (Sebbenn & Seoanne, 2004).

Para as espécies arbóreas florestais é crescente a necessidade de estudos para o entendimento da estrutura genética e sistemas de reprodução, especialmente para aquelas com importância econômica e/ou ameaçadas de extinção.

*Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso (imbuia) é uma espécie arbórea, nativa da Floresta Ombrófila Mista, ocorrendo desde o estado do Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro (Carvalho, 1994). O desmatamento é considerado o principal fator que vem causando uma grave erosão genética dessa espécie (Carvalho, 2003). Apesar de sua importância econômica e ecológica para o Sul do Brasil, diversos aspectos referentes a sua genética são, ainda, desconhecidos.

O objetivo deste trabalho foi adaptar a técnica de marcadores bioquímicos (isoenzimas) para *O. porosa*, investigar a herança mendeliana desses marcadores e a existência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados, para a utilização em estudos de sistema reprodutivo, diversidade e estrutura genética.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem dos indivíduos, coleta e transporte de amostras

Para a determinação do protocolo de isoenzimas de imbuia foi utilizado material de duas procedências (Canoinhas e Caçador, ambas localizadas no estado de Santa Catarina). Foram escolhidos aleatoriamente 30 amostras, sendo 15 indivíduos de cada procedência.

Já a amostragem da população natural envolveu indivíduos encontrados em fragmentos da Floresta Ombrófila Mista (segundo Veloso *et al.*, 1991) localizados no município de Colombo – PR, nas proximidades da Embrapa Florestas (latitude 25° 20' S, longitude 49° 14' W e altitude de 920 m), em áreas naturais alteradas. Devido ao atual estado de degradação das florestas não foi encontrada área inalterada na região desejada. O clima da região é classificado, segundo Koeppen, como do tipo Cfb, sempre úmido, clima pluvial quente temperado, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C e a do mês mais frio, superior a 10 °C e mais de cinco geadas por ano (Resende *et al.*, 2000).

Coletou-se material vegetal de 30 árvores adultas e sementes das mesmas para análise de progênes. Essas sementes foram distribuídas em tubetes, separadas em bandejas e identificadas por progênie para germinação em estufa.

O material testemunho da população estudada encontra-se depositado no Herbário UPCB (números de registro 49790 e 49791)

### 2.2 Procedimento de eletroforese de isoenzimas

Para a caracterização genética utilizou-se a eletroforese de isoenzimas, com base nos protocolos descritos por Alfenas (1998) e Bergmann (1991). As análises genéticas foram conduzidas no Laboratório de Genética da Embrapa Florestas, em Colombo – PR.

Dois tampões foram testados para a extração de enzimas: solução n° 1 (Alfenas, 1998) e tampão adaptado por Wendt *et al.* (2003) para erva mate.

Os tecidos foliares foram limpos e triturados em microtubos utilizando-se nitrogênio líquido, com adição de 240 µL de tampão de extração para cada amostra (0,075 – 0,1 mg de folhas) e 0,01 g de Polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após centrifugação, os “wicks” (papel Whatman número 3) foram

utilizados para absorção dos extratos protéicos. Os mesmos foram separados em microplacas e armazenados em “freezer“ a uma temperatura de – 80 °C até a sua utilização.

A eletroforese de isoenzimas, horizontal, foi conduzida em gel de penetrose 30 (amido de milho) na concentração de 13 % e sacarose a 1,35 %. Cada gel comportava 30 amostras. O monitoramento da corrida foi feito usando wicks embebidos em solução de azul de bromofenol 1 %. A regulação da corrente elétrica foi adaptada para cada sistema utilizado. Ao término da corrida, o gel era seccionado em fatias permitindo a revelação de até 5 sistemas enzimáticos. A corrida foi realizada em geladeira para preservar a atividade enzimática.

Foram testados 20 sistemas enzimáticos (Tabela 1) em 6 sistemas de gel-eletrodo (Tabela 2). Alguns destes diferenciaram-se entre si somente pelo aumento do pH do tampão do gel (Tabela 3), visando melhor separação e nitidez de bandas.

TABELA 1: Sistemas enzimáticos testados em *Ocotea porosa*

Enzima	Sigla	Referência (E.C.)
Aconitase	ACO	4.2.1.3
Álcool Desidrogenase	ADH	1.1.1.1
Alfa - Esterase	$\alpha$ -EST	3.1.1.1
Beta - Esterase	$\beta$ -EST	3.1.1.1
Enzima Málica	ME	1.1.1.40
Fosfatase Ácida	ACP	3.1.3.2
Formato Desidrogenase	FDH	1.2.1.2
6-Fosfogluconato Desidrogenase	6PGDH	1.1.1.44
Fosfogluco Isomerase	PGI	5.3.1.9
Fosfogluco Mutase	PGM	2.7.5.1
Glucose-6-Fosfato Desidrogenase	G6PDH	1.1.1.49
Glicerato 2 Desidrogenase	G2D	1.1.1.29
Glutamato Desidrogenase	GTDH	1.4.1.3
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	GOT	2.6.1.1
Isocitrato Desidrogenase	IDH	1.1.1.42
Leucina Aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
Malato Desidrogenase	MDH	1.1.1.37
NADH Desidrogenase	NDH	1.6.99.3
Chiquimato Desidrogenase	SKDH	1.1.1.25
Superóxido Dismutase	SOD	1.15.1.1

E.C.= Enzyme Commission

TABELA 2: Sistemas de gel-eletrodo investigados para o estabelecimento do protocolo de isoenzimas de *O. porosa*.

Sistema	Fonte	Tampão do eletrodo (pH)	Tampão do gel (pH)
Tris-Citrato	Sistema 05 (Alfenas, 1998)	7,5	7,50
	Sousa & Hattemer (2003)*	7,5	7,50
	Sousa & Hattemer (2003)*	7,8	7,80
	Sousa & Hattemer (2003)*	8,1	8,10
Tris-Histidina Citrato	Sistema 23 (Alfenas, 1998)	7,0	7,00
Lítio-Borato	Sousa & Hattemer (2003)*	8,1	8,10
Morfolina-Citrato	Sistema 8 (Alfenas, 1998)	6,1	6,10
	Sistema 9 (Alfenas, 1998)	6,1	7,10
Scandalios	Sistema 18 (Alfenas, 1998)*	8,3	8,65
Poulik	Sistema 14 (Alfenas, 1998)*	8,0	8,65

\* Com adaptações

TABELA 3: Composição química dos sistemas utilizados para o estabelecimento do protocolo de isoenzimas de *O. porosa*.

Sistema	Tampão do Eletrodo	Tampão do Gel	Condições de Corrida
Tris-citrato (Alfenas, 1998)	Tris 0,223 mol.L <sup>-1</sup>	Tris 0,223 mol.L <sup>-1</sup>	80 V cte durante 4h e 30 min.
	Ácido cítrico 0,086 mol.L <sup>-1</sup>	Ácido cítrico 0,086 mol.L <sup>-1</sup> Diluição: 3,5 %.	
Tris-citrato (Sousa & Hattemer, 2003)	Tris 0,149 mol.L <sup>-1</sup>	Tris 0,149 mol.L <sup>-1</sup>	150 V cte durante 5h e 30 min
	Ácido cítrico 0,043 mol.L <sup>-1</sup>	Ácido cítrico 0,043 mol.L <sup>-1</sup> Diluição: 1 tampão: 3 água	
Tris-Histidina Citrato	Tris 0,125 mol.L <sup>-1</sup>	DL – Histidina HCl.1 H <sub>2</sub> O	75 mA cte. durante 5h e 30 min.
	Titular com Ácido cítrico 1 M.	0,050 mol.L <sup>-1</sup> EDTA Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,001 mol.L <sup>-1</sup> Titular com Tris 1 M. Diluição: 1 tampão: 4 água.	
Lítio-borato	Ácido bórico 0,191 mol.L <sup>-1</sup>	Tris 0,051 mol.L <sup>-1</sup>	75 mA cte durante 5h
	Hidróxido de lítio 0,042 mol.L <sup>-1</sup>	Ácido cítrico 0,009 mol.L <sup>-1</sup> 5 % (v/v) tampão do eletrodo	
Morfolina-citrato	Ácido cítrico 0,040 mol.L <sup>-1</sup>	Ácido cítrico 0,040 mol.L <sup>-1</sup>	60 mA cte durante 5h
	Titular com N-(aminopropil) morfolina.	Titular com N-(aminopropil) morfolina. Diluição: 1 tampão: 20 água	
Scandalios	Ácido bórico 0,192 mol.L <sup>-1</sup>	Tris 0,051 mol.L <sup>-1</sup>	67 mA cte durante 5h e 30 min.
	Hidróxido de lítio 0,050 mol.L <sup>-1</sup>	Ácido cítrico 0,008 mol.L <sup>-1</sup>	
Poulik	Ácido bórico 0,300 mol.L <sup>-1</sup>	Tris 0,076 mol.L <sup>-1</sup>	55 mA cte durante 4h e 30 min.
	Hidróxido de sódio 0,050 mol.L <sup>-1</sup>	Ácido cítrico 0,005 mol.L <sup>-1</sup>	

cte = constante

Após a seleção de enzimas, otimizou-se o meio suporte empregado para o do sistema Tris-Citrato, visando maior nitidez dos locos e alelos. Foram testadas diferentes concentrações de sacarose e penetrose em relação ao sistema inicial. As concentrações encontram-se descritas na Tabela 4.



TABELA 4. Concentrações de sacarose e penetrose testados no sistema Tris-Citrato

Meio suporte	Penetrose (%)	Sacarose (%)
Inicial	13,0	1,35
1	10,5	1,35
2	10,5	3,00

### 2.3 Interpretação de zimogramas

A avaliação das zonas e variantes (denominados locos e alelos, respectivamente, após a análise de herança) identificados no gel (zimograma) foi realizada segundo a sua resolução e atividade, adotando-se os seguintes critérios: ótimo (+), regular (+/-), ruim (-), sem atividade (S.A.) e não testado (N.T.).

A interpretação dos zimogramas seguiu padrões descritos por Alfenas (1998). A identificação de zonas codificadoras foi realizada a partir da zona mais rápida (mais catódica) para a mais lenta (anódica). A zona mais rápida é denotada primeira, sendo as zonas subseqüentes numeradas em ordem crescente. Esta identificação foi aplicada tanto para locos como alelos.

### 2.4 Análise de dados

#### 2.4.1 Análise de segregação

O estudo da herança dos marcadores isoenzimáticos para a *Ocotea porosa* foi realizado com base no método descrito por Gillet & Hattemer (1989). Este método compara o genótipo da árvore materna com a segregação de suas progênies de polinização aberta. As seguintes condições devem ser satisfeitas: 1) toda progênie da árvore materna  $A_iA_i$  deve possuir o alelo  $A_i$  da árvore-mãe; 2) no caso de uma árvore-mãe heterozigota ( $A_iA_j$ ,  $i \neq j$ ): 2.1) cada indivíduo da progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna,  $A_i$  ou  $A_j$ , 2.2) o número de progênies heterozigotas  $A_iA_j$  ( $N_{ij}$ ) deve ser igual a soma das progênies homozigotas  $A_iA_i$  ( $N_{ii}$ ) e  $A_jA_j$  ( $N_{jj}$ ),  $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ , 2.3) o número de progênies heterozigotas  $A_iA_k$  ( $N_{ik}$ ) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas  $A_jA_k$  ( $N_{jk}$ ),  $N_{ik} = N_{jk}$ , com  $k \neq i, j$ .

Foi utilizado o teste  $G$  (Sokal & Rohlf, 1981), com um grau de liberdade, para comparar os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas, com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. Posteriormente todos os testes individuais foram somados e um teste  $G$  total foi obtido ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ), com  $n$  graus de liberdade, sendo  $n$  o número de progênies usadas para o teste. Os fenótipos observados foram então somados e um teste  $G$  agrupado para a segregação 1:1 foi obtido ( $G_{1:1Agrupado}$ ), com um grau de liberdade. A hipótese de heterogeneidade de segregação entre progênies foi realizada usando-se um teste  $G$  de heterogeneidade ( $\sum G_{heterogeneidade}$ ), através da subtração do teste  $G$  agrupado ( $G_{1:1Agrupado}$ ), do teste  $G$  total ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ). Esses testes são aditivos de forma que  $\sum G_{Hipótese1:1} = \sum G_{Heterogeneidade} + G_{1:1Agrupado}$ , com  $n$ ,  $n-1$  e  $1$  grau de liberdade, respectivamente (Sousa *et al.*, 2002).

#### 2.4.2 Análise de desequilíbrio de ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows,  $\Delta_{ij}$  (Weir, 1979), usando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 1999). A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows é a mais indicada em situações em que a união de gametas pode não ter ocorrido de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir & Cockerham, 1979). A hipótese de segregação independente foi testada com o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) descrito por Weir (1979).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Eletroforese de isoenzimas

O tampão de extração que apresentou os melhores resultados foi o adaptado para erva-mate, descrito por Wendt *et al.* (2003).

Dos 20 sistemas enzimáticos testados para o estabelecimento do protocolo, 10 apresentaram boa resolução. As enzimas GTDH, ADH, G-6-PDH e ME foram monomórficas para a maioria dos sistemas testados. ACP, SOD, ACO, FDH, LAP e G2D tiveram baixa atividade enzimática e/ou resolução. Melhor atividade e resolução foram encontradas para as enzimas GOT, PGM, MDH, 6-PGDH, IDH, PGI, NDH, SKDH,  $\alpha$  EST e  $\beta$  EST, apresentando pelo menos um loco polimórfico. Entretanto, somente as enzimas GOT, PGM, MDH e 6-PGDH não apresentaram locos e/ou alelos sobrepostos, e mantiveram boa atividade nas progênes, sendo, portanto selecionadas neste estudo. Os resultados dos sistemas enzimáticos e tampões gel/eletrodo são apresentados resumidamente nas Tabelas 5 e 6. O nível de polimorfismo encontrado na população analisada pode divergir do resultado para a definição do protocolo, uma vez que foram testados poucos indivíduos nessa etapa do protocolo de isoenzimas.

Para a análise genética utilizaram-se as enzimas MDH e 6-PGDH no sistema Tris-Citrato pH 7,8 e as enzimas GOT e PGM no sistema Lítio Borato pH 8,1. Para a análise das progênes, foram utilizadas as enzimas MDH, 6-PGDH e GOT nos sistemas descritos.

O gel que apresentou melhor separação e resolução de bandas continha penetrose a 10,5 % e sacarose 3 % (meio suporte 2), tendo sido, portanto, utilizado no sistema Tris Citrato pH 7,8.

TABELA 5: Resolução e atividade em relação aos sistemas enzimáticos e tampões de gel/eletrodo empregados em *O. porosa*.

	TC 7,5 <sup>†</sup>		TC 7,5 <sup>‡</sup>		TC 7,8 <sup>‡</sup>		TC 8,1 <sup>‡</sup>		THC 7,0	LB 8,1	MC 6,1	MC 7,1	SCA 8,65	POU 8,65						
	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R						
GTDH	1	1	3	2	1	1	-	-	3	3	2	3	3	2	2	2	1	1	2	
MDH	1	2	2	2	2	1	3	3	1	1	3	3	2	2	2	1	3	2	3	3
ACP	2	3	2	3	3	2	-	-	2	3	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3
SKDH	1	2	0	0	1	2	-	-	2	3	3	3	3	3	1	1	2	3	2	3
IDH	-	-	3	2	2	1	3	3	3	3	3	3	2	3	2	3	3	2	3	3
ADH	-	-	3	3	3	3	-	-	3	2	0	0	3	2	2	2	2	2	0	0
SOD	-	-	-	-	0	0	-	-	3	3	0	0	-	-	3	2	0	0	0	0
α EST	-	-	-	-	2	2	-	-	3	3	1	1	-	-	2	2	2	1	1	2
β EST	-	-	-	-	2	2	-	-	2	1	2	1	-	-	2	3	2	2	-	-
ACO	-	-	-	-	0	0	-	-	0	0	2	3	-	-	0	0	0	0	0	0
LAP	-	-	-	-	3	3	-	-	3	3	2	2	-	-	0	0	2	2	2	3
6PGDH	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	3	-	-	1	1	2	3	N	N
G6PDH	1	2	1	1	1	1	-	-	3	3	3	3	-	-	3	3	2	2	2	2
ME	2	3	2	3	1	2	-	-	N	N	N	N	0	0	N	N	3	3	3	3
G2D	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0	N	N	-	-	0	0	3	3	0	0
FDH	-	-	-	-	3	3	-	-	3	2	0	0	0	0	3	3	0	0	3	3
NDH	-	-	1	2	2	2	3	2	3	2	3	3	0	0	2	2	0	0	3	3
GOT	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PGM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PGI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-

A: atividade; R: resolução; 1: ótima; 2: regular; 3: ruim; 0: Sem atividade; - : não testado; N: não interpretado

†Sistema 05 (Alfenas, 1998)

‡Sousa &amp; Hattemer (2003)

TABELA 6: Polimorfismo em relação aos sistemas enzimáticos e tampões de gel/eletrodo utilizados em *O. porosa*.

	TC 7,5 <sup>†</sup>		TC 7,5 <sup>‡</sup>		TC 7,8 <sup>‡</sup>		TC 8,1 <sup>‡</sup>		THC 7,0	LB 8,1	MC 6,1	MC 7,1	SCA 8,65	POU 8,65
GTDH	M	M	M				M	P	M		M	M	M	M
MDH	P	P	P				P		P		P	P	P	
ACP	P	P	P							P				
SKDH	P		P								P	P	P	P
IDH		P	P								P	P	P	
ADH							M			M	M	M	M	
SOD												P		
α EST			P					P			P	P	P	M
β EST			P				P	P					P	
ACO														
LAP									M				P	
6PGDH	P	P	P	P	P	P	P					P		N
G6PDH	M	M	M						M				M	P
ME	M		M				N	N			N			
G2D									N					
FDH			M											
NDH		P	P									P		
GOT									P					
PGM									P					
PGI									N					

M: monomórfico; P: polimórfico; N: não interpretável

†Sistema 05 (Alfenas, 1998)

‡Sousa &amp; Hattemer (2003)

### 3.1.2 Padrões das isoenzimas

Os padrões isoenzimáticos dos sistemas utilizados ainda não foram descritos para *O. porosa*. Por esse motivo, os dados obtidos serão comparados com outras espécies florestais.

#### 3.1.2.1 Locos monomórficos

##### *Álcool Desidrogenase (ADH)*

Observou-se apenas uma zona monomórfica nos sistemas analisados. Esse padrão foi encontrado por Wendt (2005) em *I. paraguariensis* e por Chung *et al.* (2000) em *Neolitsea sericea*, uma espécie da Família Lauraceae. Póvoa (2002) e Melo Júnior (2003), em *Cedrella fissilis* e *Caryocar brasiliense*, respectivamente, descrevem a estrutura da enzima como monomérica, embora a literatura a indique como dimérica.

##### *Enzima Málica (ME)*

Essa enzima apresentou uma zona com apenas um alelo presente. Melo Júnior (2003) descreve a enzima como monomérica.

##### *Glucose-6-Fosfato Desidrogenase (G-6-PDH)*

Esse sistema apresentou monomorfismo na maioria dos sistemas testados. No estudo com *Caesalpinia echinata*, Giudice-Neto *et al.* (2004) relataram a presença de uma zona monomérica, o mesmo apresentado por Ribas & Sebbenn (2004a) em *Trema micrantha* e por Gusson & Sebbenn (2004) com *Eschweilera ovata*.

##### *Glutamato Desidrogenase (GTDH)*

Somente uma zona monomórfica foi detectada em *O. porosa*. Foram descritas estruturas monoméricas por Melo Júnior (2003), com três alelos, e Póvoa (2002) com três locos e dois alelos cada.

### 3.1.2.2 Locos polimórficos

#### *Esterases ( $\alpha$ e $\beta$ -EST)*

As enzimas esterases ( $\alpha$  e  $\beta$ ) revelaram três zonas, sendo que as duas primeiras apresentaram estrutura monomérica com dois alelos cada. A zona mais lenta apresentou baixa atividade enzimática, não sendo possível a identificação dos alelos em ambas os sistemas. Sua atividade era reduzida nas progênes, impossibilitando sua interpretação.

Zonas monoméricas foram identificadas por Seoane & Sebbenn (2004) em *Esenbeckia leiocarpa*, e por Giudice-Neto *et al.* (2004).

#### *6-Fosfogluconato Desidrogenase (6-PGDH)*

Foram reveladas três zonas no gel, sendo que a primeira apresentou estrutura monomérica com dois alelos e as demais foram monomórficas.

Sebbenn *et al.* (2000) obtiveram com *Cariniana legalis* uma zona com característica monomérica, Wendt (2005) e Sousa *et al.* (2002) descrevem zonas com estrutura dimérica, em *I. paraguariensis* e *Araucaria angustifolia* respectivamente.

#### *Fosfogluco Isomerase (PGI)*

Para esse sistema foram observadas três zonas, sendo que a primeira apresentou dois alelos e estrutura monomérica. As zonas subsequentes apresentaram alto polimorfismo havendo sobreposição de locos e alelos, gerando um zimograma de difícil interpretação.

Diversos trabalhos relatam zonas com estrutura dimérica, tais como Ribas & Sebben (2004b) em *Cecropia pachystachya*, Sebbenn (2004) em *Genipa americana* e Moraes *et al.* (2004) com *Myracrodruon urundeuva*,

#### *Fosfogluco Mutase (PGM)*

Apenas uma zona foi revelada, com 2 alelos, e estrutura monomérica. O mesmo padrão foi encontrado por Sousa *et al.* (2002), e por Ribeiro & Lovato (2004) em *Senna multijuga*. Locos diméricos foram descritos por Sebbenn & Seoane (2004) em *Tabebuia cassinoides*.

### *Glutamato Oxaloacetato Transaminase (GOT)*

Neste sistema foram identificadas três zonas polimórficas, onde a primeira apresentou padrão dimérico, com 3 alelos. As segunda e terceira zonas apresentaram intensidade das bandas muito fracas e com sobreposição de alelos, impossibilitando a sua interpretação.

O padrão da estrutura enzimática dimérico foi também relatado por Moraes (1997), Moraes *et al.* (2004) e por Ribas & Sebbenn (2004a).

### *Isocitrato Desidrogenase (IDH)*

A enzima IDH revelou três zonas, todas polimórficas. As zonas um e dois apresentaram três alelos e estrutura dimérica, com sobreposição de locos e alelos, resultando um zimograma de difícil interpretação. A zona mais lenta do gel apresentou baixa atividade enzimática, impossibilitando sua interpretação.

Estruturas diméricas foram reportadas por Ribas & Sebbenn (2004b) e por Sebbenn & Seoane (2004).

### *Malato Desidrogenase (MDH)*

Foram identificadas quatro zonas neste sistema, com a segunda zona apresentando dois alelos e estrutura monomérica. A primeira e terceira zonas foram monomórficas. A quarta zona apresentou-se polimórfica, porém não foi interpretada devido à baixa resolução e atividade apresentada.

Diversos trabalhos descrevem a estrutura enzimática como dimérica (Wendt, 2005; Sebbenn, 2004; Zanetto *et al.*, 1996; Finkeldey *et al.* 1998), enquanto outros trabalhos a retratam como monomérica, como Gusson & Sebbenn (2004) e Melo Júnior (2003).

### *NADH Desidrogenase (NDH)*

Para essa enzima duas zonas foram reveladas no gel, mas apenas a região mais lenta foi interpretável, apresentando quatro alelos. Os heterozigotos apresentavam duas bandas, caracterizando a enzima como monomérica. Sua atividade era reduzida nas progênies, impossibilitando sua interpretação.

Duas zonas de atividade foram observadas para essa enzima, com estrutura monomérica, nos trabalhos de Wendt (2005) e Gusson & Sebbenn (2004).

#### *Shikimate Desidrogenase (SKDH)*

Apenas uma zona com três alelos foi visualizada, apresentando estrutura monomérica. A mesma estrutura foi descrita em Sousa *et al.* (2002), Sebbenn & Seoane (2004) e Ribas & Sebbenn (2004b).

Por não apresentar uma boa resolução para os sistemas selecionados, esta enzima foi excluída de análise genética de população e progênes.

### **3.1.3 Definição dos sistemas enzimáticos para *O. porosa***

Neste estudo, nove sistemas enzimáticos apresentaram variação. Entretanto, as enzimas esterases foram excluídas, pois diversos autores afirmam serem influenciadas pelo ambiente, induzindo falsas estimativas das frequências alélicas e hiperestimativas dos níveis de heterozigidade (Chagala 1996; Sousa, 2000). Além disso, sua atividade era muito reduzida nas progênes, impossibilitando a análise de segregação.

As enzimas PGI e IDH apresentaram complicado padrão enzimático, com sobreposição de locos e alelos, não permitindo a interpretação confiável dos fenótipos no gel. Já a enzima NDH apresentou insuficiente separação de alelos, sendo, portanto, descartada das análises.

Os locos passíveis de interpretação dessas enzimas foram consideradas somente na estimativa para o cálculo do número de locos polimórficos e monomórficos, bem como o número médio de alelos por loco.

Na Figura 1 estão representados esquematicamente os padrões dos zimogramas obtidos nos sistemas enzimáticos GOT, 6-PGDH, PGM e MDH, selecionados para análise em *O. porosa*.



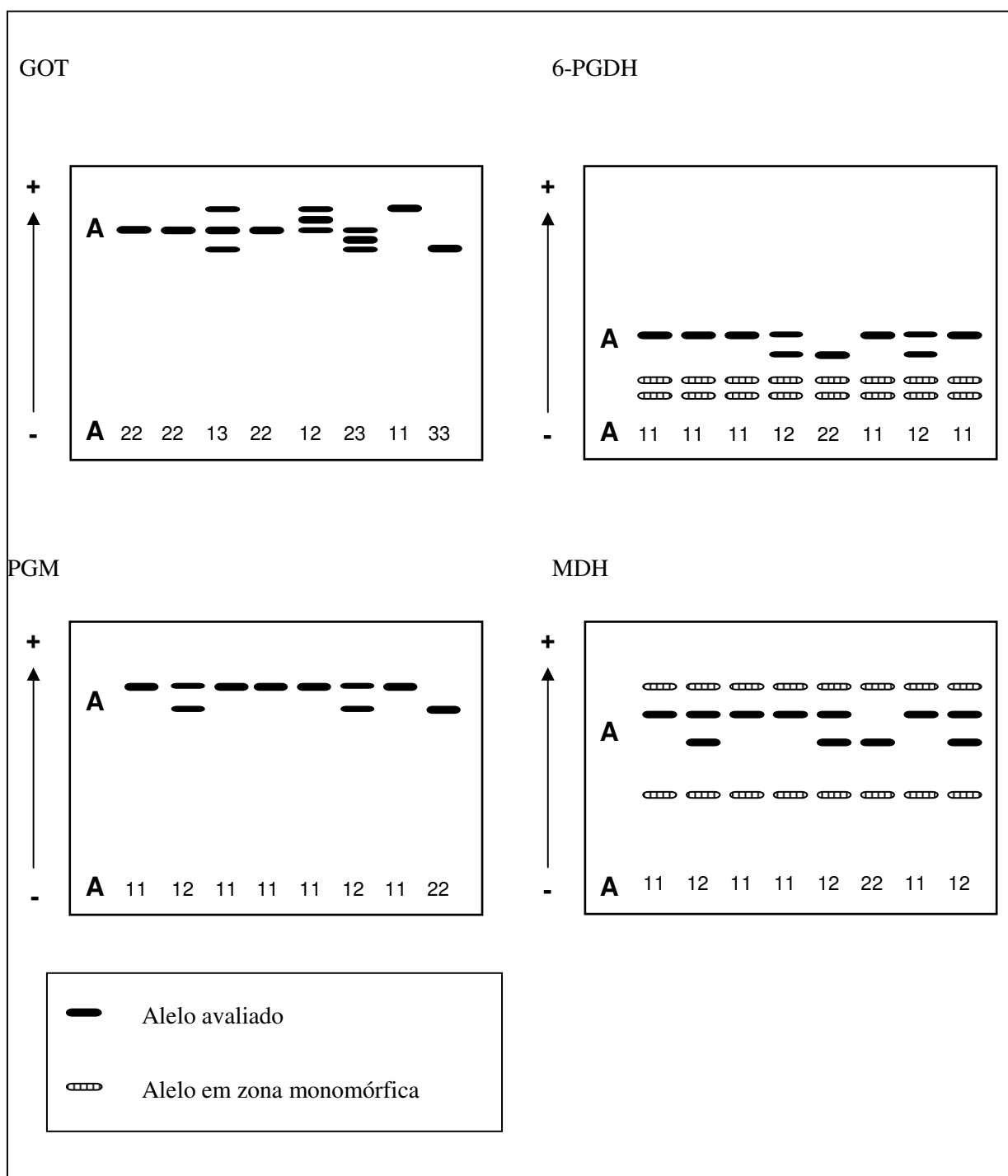


FIGURA 1. Representação esquemática dos fenótipos observados, representados por números, nos zimogramas de *O. porosa* para os sistemas GOT, 6-PGDH, PGM e MDH. Alelos rachurados encontram-se nas zonas monomórficas e alelos em preto indicam as zonas analisadas

### 3.2 Análise de segregação

Para a análise de segregação, foram escolhidas as enzimas GOT e 6-PGDH. A enzima MDH, utilizada para análise das progênies, foi excluída já que as árvores maternas não apresentaram genótipo heterozigoto.

As árvores de *O. porosa* analisadas no loco GOT-A não apresentaram desvio de segregação, tanto no teste  $G$  total ( $\sum G_{Hipótese1:1}$ ), de heterogeneidade ( $\sum G_{Heterogeneidade}$ ) como no teste da hipótese de segregação agrupada 1:1 ( $G_{1:1Agrupado}$ ), permitindo considerar que essa zona de atividade está sob controle de um loco de herança codominante (Tabela 7).

Ribas & Sebbenn (2004a) detectaram desvios de segregação significativos em três árvores heterozigotas  $A_2A_3$  no sistema GOT, mas houve ausência de desvio quando duas destas árvores foram excluídas. Quatro mães heterozigotas  $A_1A_3$  foram também analisadas, não apresentando desvio de segregação. Moraes *et al.* (2004) encontraram indícios significativos de heterogeneidade no padrão de segregação no sistema GOT em um dos locos analisados. Segundo os autores, dos onze indivíduos testados que possuíam mãe heterozigota, sete apresentaram desvios de segregação. Mas após a exclusão destes, sobrando apenas quatro, houve equilíbrio de segregação.

O loco 6-PGDH-A, em *O. porosa*, apresentou excesso de indivíduos homozigotos, provocando desvios de segregação significativos a 1% de probabilidade em todos os testes realizados (Tabela 7). Desvios de segregação foram observados em onze amostras, num total de treze árvores analisadas. Observou-se um excesso de homozigotos do tipo  $A_1A_1$ , para um número considerável de árvores, sugerindo a existência de um alelo nulo segregando nesse loco. Como os alelos nulos não são detectados, os indivíduos homozigotos para esse alelo não são revelados e os heterozigotos aparecem com uma simples banda nos géis, sendo considerado como homozigotos para o alelo alternativo do alelo nulo (Sebbenn & Seoane, 2004).

Diversos autores têm relatado distorções de segregação em locos da enzima 6-PGDH em espécies arbóreas, tais como Gusson & Sebbenn (2004), Sebbenn (2004), Giudice-Neto *et al.* (2004), Sebbenn & Seoane (2004) e Sousa *et al.* (2002).

Desvios de segregação mendeliana têm sido observados em vários estudos da herança isoenzimática em espécies arbóreas. Diversas causas podem ser atribuídas a esse comportamento, tais

como as isoenzimas estarem sob controle de mais de um loco, seleção, distorções meióticas, interações interalélicas e deriva genética (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985). Uma outra razão pode ser a presença de alelos nulos (Gillet & Hattemer, 1989). Segundo Sousa (2000), distorções de segregação também podem ser causadas pela vantagem seletiva do alelo mais freqüente no loco. Entretanto, desvios observados podem incluir um ou mais desses fatores, sendo difícil a determinação de sua causa real.

No loco 6-PGDH-A, das treze progênies observadas, onze apresentaram desequilíbrio de segregação. Sendo assim, nas condições desse trabalho não se recomenda o uso do loco 6-PGDH-A até que estudos incluindo um maior número de heterozigotos possa esclarecer melhor a segregação nesse loco.

Pode-se afirmar que somente o loco GOT-A em *O. porosa* esteja sob controle genético e segregue nas proporções mendelianas 1:1, podendo ser utilizado em estudos genéticos populacionais, sistemas de reprodução e análise de paternidade nessa espécie.

TABELA 7. Teste para hipótese de segregação regular ( $G$ ) de marcadores isoenzimáticos em *O. porosa*.

Loco	Genótipo materno	Caso	Número de árvores ( $n$ )	$\sum N_{ij} : \sum (N_{ii} + N_{jj})$	$\sum N_{ik} : \sum N_{jk}$	$\sum G_{Hipótese 1:1}$ GL = $n$	$\sum G_{Heterogeneidade}$ GL = $n-1$	$G_{1:1 Agrupado}$ GL = 1	G	Árvores com desvio de segregação
GOT-A	$A_1A_2$	a	5	59:73	6:3	14,09	12,61	1,49		-
	$A_2A_3$	a	3	40:35	2:0	1,53	1,20	0,33		-
6-PGDH-A	$A_1A_2$	a	13	82:269	-	128,12 **	23,15 **	104,97 **		11
		b	2	20:20	-	1,93	1,93	0		-

$N_{ij}$  e  $N_{ii}+N_{jj}$  são os números observados dos genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

a Inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco.

b Exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(\*\*)  $P < 0,010$ ; (\*)  $P < 0,050$ .

TABELA 8. Árvores de *O. porosa* com desvios de segregação da razão esperada 1:1, para o loco enzimático 6-PGDH-A.

Árvore	Genótipo materno	Tamanho da amostra	Segregação observada			$\chi^2 (A)$ $N_{ii} + N_{jj} = N_{ij}$
			$N_{ii}$	$N_{jj}$	$N_{ij}$	
3	$A_1A_2$	28	23	0	5	11,57 **
7	$A_1A_2$	30	22	0	8	6,53 *
8	$A_1A_2$	29	25	0	4	15,21 **
10	$A_1A_2$	28	23	0	5	11,57 **
11	$A_1A_2$	30	24	0	6	10,8 **
12	$A_1A_2$	29	23	0	6	9,97 **
13	$A_1A_2$	27	19	0	8	4,48 *
21	$A_1A_2$	29	22	0	7	7,76 **
22	$A_1A_2$	28	22	1	5	11,57 **
24	$A_1A_2$	30	27	0	3	19,2 **
25	$A_1A_2$	23	18	0	5	7,35 **

(\*\*)  $P < 0,010$ ; (\*)  $P < 0,050$ .

### 3.3 Análise de desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação foi estudado considerando as combinações dos quatro locos avaliados na população de *O. porosa*, totalizando seis pares de combinações possíveis entre esses locos enzimáticos.

Não foram encontrados desvios significativos na hipótese de segregação independente. A baixa magnitude da medida de desequilíbrio de ligação de Burrows ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ) para todas as combinações testadas, revela que as ligações entre os locos são fracas (já que a amplitude de valores dessa estimativa possa assumir valores entre -0,25 e 0,25). A maior medida de desequilíbrio de ligação ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ) foi observada entre a combinação dos locos *GOT-A: MDH-B* (0,029) (Tabela 9).

TABELA 9. Medida composta de Burrows para o desequilíbrio gamético ( $\hat{\Delta}_{ij}$ ) e testes de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para a hipótese de segregação independente nas combinações dos locos isoenzimáticos utilizados em *O. porosa*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	$\chi^2$
<i>6-PGDH-A: PGM-A</i>	-0,007	0,79
<i>MDH-B: PGM-A</i>	-0,001	0,04
<i>MDH-B: 6-PGDH-A</i>	0,021	1,21
<i>GOT-A: PGM-A</i>	-0,005	0,39
<i>GOT-A: 6-PGDH-A</i>	-0,005	0,07
<i>GOT-A: MDH-B</i>	0,029	2,68

O desequilíbrio de ligação entre os sistemas utilizados em *O. porosa* foram analisados por diversos autores em outras espécies. Gusson & Sebbenn (2004) e Sebbenn (2004) combinaram locos entre os sistemas enzimáticos *6-PGDH: MDH*. Além de compararem esses dois sistemas, Giudice-Neto *et al.* (2004) e Sebbenn & Seoane (2004) analisaram também a correlação entre locos de *6-PGDH: PGM* e *MDH: PGM*. Ribas & Sebbenn (2004a) verificaram a ligação entre os locos *GOT: MDH*, e Moraes *et al.* (2004) em *GOT: 6-PGDH*, *GOT: PGM* e *6-PGDH: PGM*. Os autores afirmam que não foram detectados fortes indícios de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos descritos, podendo então afirmar que os alelos dos diferentes locos analisados não estão associados e segregam independentemente entre si.

Sousa *et al.* (2002) detectaram desequilíbrio de ligação em *Araucaria angustifolia*, utilizando cinco sistemas enzimáticos (GOT, 6-PGDH, MDH, PGM E SKDH), dentre os quais os quatro primeiros foram utilizados em *O. porosa*.

A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows indicou que, em *O. porosa*, para os locos analisados, os níveis de ligação são fracos e, portanto, não devem influenciar as estimativas multilocos de parâmetros genéticos.

Nas combinações entre os locos isoenzimáticos analisados não foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação, indicando que os alelos dos diferentes locos não estão ligados ou em desequilíbrio gamético, segregando independentemente entre si.

#### 4. CONCLUSÕES

1. O loco GOT-A é um marcador genético encontrado nesse trabalho, já que o mesmo apresentou segregação mendeliana na proporção esperada e ausência de ligação, podendo ser utilizado em estudos genéticos de *O. porosa*;
2. O loco 6-PGDH-A não pôde ser validado nesse estudo já que não apresentou segregação regular. Embora o número de indivíduos esteja dentro do recomendado para estudos de populações, aconselha-se novos estudos com um número bem mais expressivo de indivíduos. A validação do loco poderá ser feita também com o incremento do número de indivíduos analisados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity**, v. 71, p. 33-40, 1980.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 1998. 574 p.

BERGMANN, F. Isozyme gene markers. In: MÜLLER-STARCK & ZIEHE, M. (eds) **Genetic variation in European populations of forest trees**. Sauerländer's Verlag: Frankfurt am Main, 1991. 271 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Volume 1. Brasília: Embrapa/Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa – CNPq; Brasília, DF: Embrapa – SPI, 1994. 640 p.

CHAGALA, E. M. Inheritance and linkage of allozymes in *Pinus strobus* L. **Silvae Genetica**, v. 45, p. 181-187, 1996.

CHELIAK, W. M.; PITEL, J.A. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, v.34, p. 142-148, 1985.

CHUNG, M. G.; CHUNG, M. Y., OH, G. S.; EPPERSON, B. K. Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* population (Lauraceae). **Heredity**, n. 85, p. 490-497, 2000.

FINKELDEY, R.; GUZMAN, N. de; CHANGTRAGOON, S. Inheritance of isozyme phenotypes in *Pterocarpus indicus* Willd. **Forest Genetics**, v. 3, n. 3, p. 165-170, 1998.



GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, v. 63, p. 135-141, 1989.

GIUDICE-NETO, J. D.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Herança e ligação em locos isoenzimáticos de *Caesalpinia echinata* L. (pau-brasil). **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n.2, p.101-110, 2004.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos de *Eschweilera ovata*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n. 2, p. 129-136, 2004.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: versão 1.1 para Windows 95/NT**. 1999. Disponível:<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>.

MELO JÚNIOR, A. F. de. **Variabilidade genética em populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) caracterizada por meio de isoenzimas**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

MORAES, P. L. R. de. **Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees & Matius ex Nees (Lauraceae)**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 1997.

MORAES, M. L. T. de; MORAES, S. M. B.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A. M. Análise genética de fenótipos isoenzimáticos e desequilíbrio de ligação em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n. 2, p. 83-90, 2004.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

PÓVOA, J. S. R. **Distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas.** Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

RESENDE, M. D. V de. DE; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P. de; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, J. S. C. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. Colombo: Embrapa Florestas. **Circular Técnica**, n. 43, 2000. 66 p.

RIBAS, L. A.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em locos de isoenzimas de *Trema micrantha*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n.1, p. 73-81, 2004a.

RIBAS, L. A.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em sete locos isoenzimáticos de *Cecropia pachystachya*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n.2, p. 111-119, 2004b.

RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 418-424, 2004.

SEBBENN, A. M. Herança e ligação em locos de isoenzimas em *Genipa americana* L. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n. 1, p. 65-72, 2004.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Mating system in populations of *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze: implications for genetic conservation and improvement. **Scientia Forestalis** , n. 58, p. 25-40, 2000.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S. Herança e ligação em isoenzimas de *Tabebuia cassinoides*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n. 2, p. 137-145, 2004.

- SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2004.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry. The Principle and Practice of Statistics in Biological Research**. 2 ed. San Francisco, USA: W. H. Freeman and Co., 1981. 859 p.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, n. 51, p. 306-317, 2003.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, v. 51, n. 5-6, p. 191-196, 2002.
- SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Göttingen, Dissertation (Doctor of Forestry Science) - University of Göttingen. 2000.
- VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. P.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity**, Lund, v. 43, p. 105-111, 1979.
- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.
- WENDT, S. N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil**. Tese de doutorado (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- WENDT, S. N.; SOUSA, V. A.; QUOIRIN, M.; STURION, J. A.; SANTOS E. C. S. Caracterização genética de populações naturais de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: **Congresso Sul-americano da erva-**

**mate**, 3., 2003, Chapecó. Anais. [Chapecó]: EPAGRI, 2003. p. 1-8. 1 CD-ROM. Seção: Conservação, Melhoramento e Multiplicação. Feira do Agronegócio da Erva-mate, 1., 2003, Chapecó. Integrar para promover o agronegócio da erva-mate.

ZANETTO, A.; KREMER, A.; MÜLLER-STARCK, G.; HATTEMER H. H. Inheritance of isozymes in pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Heredity**, v. 87, p. 364-370, 1996.

**CAPÍTULO II. VARIAÇÃO, ESTRUTURA GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE  
UMA POPULAÇÃO DE *Ocotea porosa* (NEES & MART.) BARROSO (LAURACEAE)<sup>2</sup>**

**CHAPTER II. GENETIC STRUCTURE, VARIATION AND BREEDING SYSTEM IN AN  
POPULATION OF *Ocotea porosa* (NEES & MART.) BARROSO (LAURACEAE)**

---

<sup>2</sup> Capítulo baseado nas normas da Revista Plant Systematics and Evolution

## RESUMO

O entendimento da variação e estrutura genética e sistema reprodutivo em remanescentes de populações naturais é imprescindível para embasar programas de conservação e melhoramento genético das espécies nativas ameaçadas de extinção. Nesse trabalho, foram realizados testes para avaliação do sistema reprodutivo através de polinização controlada, e analisados os padrões de variação genética de *Ocotea porosa* em uma população fragmentada e suas progênies através de marcadores isoenzimáticos. Baixas frequências alélicas foram observadas em indivíduos adultos e progênies. Houve excesso de homozigotos nas progênies. Maior variabilidade alélica foi encontrada dentro de progênies. A viabilidade do pólen foi testada através do cloreto de 2, 3 5 trifenil tetrazólio (TTC) e a receptividade estigmática através de peróxido de hidrogênio. Nas polinizações controladas foram originados frutos somente nos tratamentos de autopolinização, polinização livre e cruzada, indicando sistema misto de reprodução. Os dados sugerem que a população analisada pode apresentar efeitos decorrentes do processo de fragmentação florestal.

*Palavras-chave: Ocotea porosa, imbuia, isoenzimas, diferenciação genética, diversidade alélica, viabilidade do pólen, receptividade estigmática, polinização controlada.*

**ABSTRACT**

The knowledge about genetic structure and variation and breeding system of remaining native species threatened by extinction is very important to lead genetic and improvement programs. In this work, tests were performed for evaluation of the breeding system through controlled pollination. Genetic pattern of variation was investigated in a fragmented population of *Ocotea porosa* and in its progenies throughout biochemical markers. Low allelic frequencies were observed for both adult individuals and progenies. A homozygous excess was observed in progenies. Allelic variability was higher within progenies. Pollen viability was obtained through tetrazolium chloride (TTC) and estigmatic receptivity was checked with hydrogen peroxide. Fruits were set from controlled self pollination, opened pollination and crossed controlled pollination, suggesting a mix mating system. The observed results suggest that the fragmentation process can be influencing the genetic structure in this population.

*Key-words: Ocotea porosa, imbuia, isozyme, genetic differentiation, allelic diversity, pollen viability, stigmatic receptivity, controlled pollination.*

## 1. INTRODUÇÃO

O entendimento da estrutura genética e da ecologia das espécies dentro de remanescentes florestais fornecem importantes parâmetros que norteiam programas de recuperação dos fragmentos, de manejo e conservação das espécies (Kageyama *et al.*, 1998), principalmente as ameaçadas de extinção.

A Floresta Ombrófila Mista tem sofrido profundas transformações, apresentando crescente processo de degradação. Sendo assim, o desenvolvimento de pesquisas básicas sobre os processos ecológicos envolvidos na reprodução das plantas é fundamental para uma melhor compreensão desse bioma.

O sistema reprodutivo é um importante mecanismo na formação da estrutura genética de uma população, pois contribui para a determinação da distribuição da variabilidade entre indivíduos de uma população e dentro de suas progênies (Hamrick, 1987).

Estudos sobre o sistema reprodutivo em lauráceas são escassos. Crestana & Baitello (1988) estudando *Nectandra mollis* (H. B. K.) Nees ssp *oppositifolia* (Nees) Rohwer, verificaram o sistema reprodutivo através de polinizações controladas e a ecologia floral. Forfang & Olesen (1998) estudaram a ecologia reprodutiva de plantas femininas e masculinas de *Laurus azorica*; Niesenbaum (1992) comparou o sistema reprodutivo de *Lindera benzoin* entre plantas masculinas e femininas em ambientes de sombra e sol.

Dentre as técnicas empregadas para a caracterização genética encontram-se os marcadores isoenzimáticos, que possuem expressão co-dominante e custo relativamente baixo (Bergmann & Hattemer, 1998).

Marcadores isoenzimáticos vêm sendo utilizados com sucesso em estudos genéticos de espécies florestais (Seoane *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2002; Kageyama *et al.*, 2003; Moraes & Derbyshire, 2003 Moraes *et al.*, 2004; Wendt, 2005).

Esses marcadores permitem a obtenção de importantes parâmetros como: o número de alelos por loco, a porcentagem de locos polimórficos, diversidade genética e gamética, heterozigosidade observada e esperada, além das frequências genotípicas e alélicas.



Diversos fatores influenciam a diversidade desses parâmetros, incluindo os processos de ação antrópica. Esses processos levaram diversas espécies florestais arbóreas a uma grave erosão genética, como a imbuia (*Ocotea porosa*), a ser reconhecida como espécie ameaçada de extinção, na categoria vulnerável (IBAMA, 1992).

*O. porosa* é uma espécie arbórea nativa da Floresta Ombrófila Mista, ocorrendo desde o estado do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro (Carvalho, 1994). Apresenta pequenas flores hermafroditas de coloração branco-amareladas, com período de floração de outubro a dezembro e frutificação de fevereiro a abril (Carvalho, 2003). Lorenzi (1992) citou o florescimento entre os meses de outubro a novembro e frutificação de janeiro a março. O fruto é drupáceo (Hertel, 1974), com dispersão de sementes zoocórica, realizada principalmente por mamíferos e aves (Carvalho, 2003).

Apesar da importância econômica da imbuia, seu sistema reprodutivo é praticamente desconhecido. Por isso, este trabalho visa fornecer informações sobre o sistema reprodutivo e parâmetros genéticos sobre a variação e estrutura genética de uma população e progênes de *O. porosa*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Caracterização do local de estudo**

A amostragem da população natural de *O. porosa* envolveu indivíduos encontrados em diversos fragmentos florestais de Floresta Ombrófila Mista (segundo Veloso *et al.*, 1991) localizados no município de Colombo – PR, nas proximidades da Embrapa Florestas (latitude 25° 20' S, longitude 49° 14' W e altitude de 920 m), em áreas naturais alteradas. Devido ao atual estado de degradação e fragmentação das florestas não foi possível amostrar área inalterada na região escolhida. O clima da região é classificado, segundo *Koepen*, como do tipo *Cfb*, sempre úmido, clima pluvial quente temperado, com a temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C e a do mês mais frio, superior a 10 °C e mais de cinco geadas por ano (Resende *et al.*, 2000).

O material testemunho da população estudada encontra-se depositado no Herbário UPGB (números de registro 49790 e 49791)

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Análise isoenzimática**

##### **2.2.1.1 Amostragem dos indivíduos, coleta e transporte de amostras**

Para a caracterização da estrutura genética elegeu-se, aleatoriamente, 30 indivíduos na fase reprodutiva (adultos), distantes no mínimo 50 m entre si. Desses indivíduos coletou-se as folhas, e sementes para a análise de progênies. As sementes foram semeadas em tubetes distribuídos em bandejas, devidamente separados, identificados e levados a estufa para germinação.

Para a análise de progênies, foram utilizados 30 indivíduos por árvore, com exceção das progênies 1 e 30 (com 13 indivíduos) e 20 e 25 (24 e 23 indivíduos, respectivamente).

### 2.2.1.2 Procedimento de eletroforese de isoenzimas

Para a caracterização genética utilizou-se a eletroforese de isoenzimas, com base nos protocolos descritos por Alfenas (1998) e Bergmann (1991)

O tampão utilizado para extração de enzimas foi o descrito por Wendt *et al.* (2003). Após a maceração em microtubos, utilizando nitrogênio líquido, foi adicionado o tampão de extração e uma pitada de Polivinilpirrolidona (PVPP). Para a absorção dos extratos proteicos utilizou-se “wicks” (papéis filtro Whatman número 3). O processo de eletroforese de isoenzimas foi a horizontal, conduzida em gel de penetrose 30 na concentração de 13 % e sacarose a 1,35 % no sistema Lítio-Borato e 10,5 % de penetrose e 3 % de sacarose no sistema Tris-Citrato.

Utilizaram para a análise da população as enzimas 6-PGDH e MDH no sistema Tris-Citrato pH 7,8, e as enzimas GOT e PGM no sistema Lítio-Borato pH 8,1. Foram analisados os seguinte locos gênicos: GOT-A, 6-PGDH-A, MDH-B e PGM-A. Na análise das progênes não se utilizou a enzima PGM, sendo as demais utilizadas.

### 2.2.1.3 Caracterização da estrutura e variação genética

Os dados obtidos nos zimogramas foram tabulados e analisados através dos programas BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1997) e GSED (Gillet, 1998).

#### 2.2.1.3.1 Medidas de parâmetros genéticos básicos

##### *Frequência alélica*

A frequência alélica foi obtida pela contagem direta do número de alelos por loco. Se existe  $N_i$  cópias de  $i$ -ésimo alelo na amostra, então a frequência da amostra  $P_i$ , de  $i$ -ésimo alelo é:

$$P_i = \frac{N_i}{2N}$$

onde  $N$  é o número total de indivíduos na amostra.

### 2.2.1.3.2 Medidas de estrutura e variação genética intrapopulacional

#### *Número médio de alelos por locos (A/L)*

O número médio de alelos por locos foi calculado por:

$$A/L = \frac{\sum(A)}{\sum(PL) + \sum(ML)}$$

onde  $\sum(A)$  é o número de alelos detectados em todos os locos,  $\sum(PL)$  o número de locos polimórficos e  $\sum(ML)$  o número de locos monomórficos.

#### *Porcentagem de locos polimórficos*

Um loco é considerado polimórfico se houver no mínimo dois alelos e a frequência do mais comum for abaixo de 0,99 (Liengsiri *et al.*, 1990) ou abaixo de 0,95 (Berg & Hamrick, 1977). A percentagem de locos polimórficos foi estimada por:

$$PPL = \frac{\sum(PL)}{\sum(PL) + \sum(ML)}$$

onde  $\sum(PL)$  é o número de locos polimórficos e  $\sum(ML)$  o número de locos monomórficos.

#### *Heterozigosidade observada e esperada ( $H_o$ e $H_e = \delta_T$ )*

A medida de heterozigosidade é utilizada para caracterizar a estrutura genotípica. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) é a proporção de genótipos presentes na população em heterozigose. Pode ser calculada com base nos locos e a média de todos os locos.

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) consiste na probabilidade de dois alelos de um loco gênico, escolhidos ao acaso numa população infinita, panmítica, diferirem entre si. A  $H_e$  (Nei, 1975) foi calculada pela expressão:

$$H_e = \left( 1 - \sum_i^n p_i^2 \right)$$

onde  $p_i$  é a frequência de  $i$ -ésimo alelo em um dado loco gênico.

A medida de diferenciação genética total dentro de uma população efetivamente infinita ( $\delta_T$ ) (Gregorius, 1987), foi estimada por:

$$\delta_T = \frac{N}{N-1} \left(1 - \sum_i^n p_i^2\right)$$

onde  $p_i$  é a frequência de  $i$ -ésimo alelo em um dado loco gênico;  $N$  é o tamanho da população.

Os valores de  $\delta_T$  e  $H_e$  convergem rapidamente quando  $N$  aumenta.

#### *Diversidade alélica (v)*

A diversidade alélica ( $v$ ) de um loco corresponde ao número efetivo de alelos deste loco, sendo calculada pela expressão (Gregorius, 1978):

$$v = \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^{-1}$$

onde  $p_i$  é a frequência de  $i$ -ésimo alelo na população. O valor mínimo de  $v$  é 1,0, quando não existe variação no loco gênico e o valor mais elevado é igual ao número de alelos ( $n$ ), se todos eles forem igualmente frequentes.

#### **2.2.1.3.3. Medidas de estrutura e variação genética entre progênes**

As medidas a serem descritas são aplicadas para análise entre populações. Mas neste trabalho elas serão aplicadas para verificar a diferença entre progênes, uma vez que se tem grande interesse em determinar as diferenças existentes dentro de uma única população estudada.

#### *Estatística-F*

A estatística F de Wright (Wright, 1965) permite não apenas caracterizar como é distribuída a diversidade genética total entre as subpopulações ( $F_{ST}$ ), mas também informa sobre os níveis médios de endogamia dentro de subpopulações ( $F_{PS}$ ) e na população total ( $F_{PT}$ ).

A estatística-F (Wright, 1965) é baseada na medida de quanto as freqüências genóticas observadas desviam da esperada, em níveis hierárquicos. Os índices foram estimados por meio das seguintes expressões:

$$F_{PS} = 1 - \frac{H_{OT}}{H_{EI}} \quad F_{ST}' = 1 - \frac{H_{EI}}{H_{ET}} \quad F_{PT} = 1 - \frac{H_{OT}}{H_{OT}}$$

onde  $H_{OT}$  é a heterozigosidade observada total,  $H_{EI}$  é a heterozigosidade esperada média entre as populações e  $H_{ET}$  é a heterozigosidade esperada total.

No presente trabalho, a estatística F de Wright (Wright, 1965) foi utilizada em nível hierárquico diferente da descrita pelo autor. Portanto os códigos  $F_{ST}'$ ,  $F_{PS}$  e  $F_{PT}$  foram utilizados para diferenciar  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$  descritos por Wright (1965).

#### *Diferenciação genética $D_j$ e $\delta$*

A quantidade de diferenciação genética  $D_j$  de uma população, comparada ao restante da coleção. Corresponde à proporção dos tipos genéticos (alelos, gametas ou genótipos) que são únicos nesta população (Gregorius, 1984). Sendo assim, a população menos diferenciada (que tem menor valor de  $D_j$ ) é considerada a mais representativa da coleção. O valor de  $D_j$  para cada população (Gregorius & Roberds, 1986), foi obtido por:

$$D_j = d_o(p_j, \overline{p_j})$$

onde  $p_j$  é a distribuição da freqüência dos tipos genéticos na população  $j$ ,  $\overline{p_j}$  é a freqüência de distribuição desses tipos em todas as outras populações conjuntamente e  $d_o$  é a distância genética. A diferenciação média da população foi estimada pela expressão:

$$\delta = \sum_j C_j D_j$$

onde  $C_j$  é padrão para pesos correspondentes à proporção de indivíduos presentes em cada população. Quando todas as populações são geneticamente idênticas,  $\delta = 0,0$ , e quando não há nenhum tipo em comum,  $\delta = 1,0$ .

## **2.2.2 Sistema reprodutivo**

### **2.2.2.1 Verificação da receptividade estigmática e viabilidade do pólen**

A receptividade estigmática foi verificada com a aplicação de peróxido de hidrogênio através da técnica descrita por Zeisler (1938), em diferentes estágios de antese.

Para a estimativa da viabilidade do grão de pólen utilizou-se o teste de tetrazólio (Cloro de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio - TTC), através da técnica descrita por Stanley & Linskens (1974), com solução contendo 1 % de TTC diluído em Tampão Tris HCl 0,15M pH 7,8. O pólen utilizado foi recém coletado de 4 árvores, incluindo as três árvores das polinizações controladas. Flores foram coletadas de diversas posições da copa, sendo os estames retirados, armazenados em placas de Petri e escolhidas aleatoriamente 3 anteras por repetição, num total de 4 repetições.

Foram contados 100 grãos de pólen por repetição, sendo considerados os grãos de pólen viáveis os quais apresentavam coloração avermelhada e inviáveis os pardos e de tons alaranjados.

### **2.2.2.2 Polinizações controladas**

O sistema reprodutivo da espécie foi averiguado através de polinizações controladas, desenvolvidas com base no trabalho de Goldenberg & Shepherd (1998), da seguinte forma:

- Polinização aberta: flores marcadas, expostas ao ambiente;
- Verificação de apomixia: botões emasculados e isolados;
- Polinização cruzada: inflorescências ensacadas, sendo as flores polinizadas com pólen proveniente de outros indivíduos;
- Auto-polinização controlada: flores polinizadas com pólen proveniente do mesmo indivíduo, com ensacamento das inflorescências;
- Auto-polinização espontânea: isolamento de inflorescências.

Esse estudo foi conduzido nos anos de 2004 e 2005, sendo utilizadas diferentes árvores em ambos os anos. Como a espécie é de grande porte, todo o trabalho de campo foi realizado com o auxílio de caminhão *Muncky*.

O isolamento dos ramos foi realizado através do uso de tecido entretela, envolvendo toda a inflorescência, sendo fixado ao caule do ramo com uso de arame. Efetuou-se o isolamento na época de botão floral, para evitar a contaminação com pólen indesejado. Além disso, pelo mesmo motivo, flores doadoras de pólen foram ensacadas. No primeiro ano da realização das polinizações controladas, a transferência de pólen se deu através do uso de pincel das flores doadoras recém coletadas para as flores doadoras. No ano de 2005 as anteras recém coletadas de flores doadoras eram esfregadas no estigma da flor receptora, com o auxílio de pinça. O tecido permaneceu no ramo até a coleta dos frutos, sendo trocados quando necessários após o início da sua formação. As avaliações foram realizadas mensalmente até a coleta dos frutos.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Parâmetros genéticos

##### 3.1.1 Estrutura genética

As frequências alélicas dos locos analisados, número de indivíduos (n) e o teste de  $\chi^2$  para a população de Colombo-PR e suas progênies encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1: Frequências alélicas e teste de  $\chi^2$  para a população e progênies de *O. porosa* de Colombo – PR, para os diferentes locos analisados.

Loco	Alelo	População	N	$\chi^2$	Progênies	N	$\chi^2$
<i>GOT-A</i>	1	0,086			0,104		
	2	0,862			0,836		
	3	0,052	29	ns	0,060	795	ns
<i>MDH-B</i>	1	0,962			0,869		
	2	0,038	26	**	0,131	813	ns
<i>6-PGDH-A</i>	1	0,783			0,878		
	2	0,217	30	ns	0,121	807	ns
<i>PGM-A</i>	1	0,983			-		
	2	0,017	30	ns	-		

(\*\*)  $P < 0,010$ ; (\*)  $P < 0,050$ ; (ns) não significativo.

N = número total de indivíduos analisados (por sistema)

O loco GOT-A apresentou três alelos, sendo mais frequente o alelo  $A_2$  tanto para a população analisada (0,862) como nas progênies (0,836). Já para MDH-B o alelo  $B_1$  foi mais frequente na população (0,962) do que nas progênies (0,869). Já para 6-PGDH-A a predominância do alelo  $A_1$  foi maior nas progênies (0,878) do que na população (0,783). Observou-se no loco PGM-A uma maior frequência do alelo  $A_1$  (0,983) na população, o qual não foi utilizado na análise de progênies.

A comparação das frequências alélicas observadas e esperadas para os locos GOT-A, 6-PGDH-A e PGM-A na população e progênies, através do teste de  $\chi^2$ , foi não significativa (Tabela 1). Já para o loco MDH-B houve desvio significativo a 1 % de probabilidade.

### 3.1.2 Variação genética

Dos 20 locos observados nas análises isoenzimáticas, 14 foram polimórficos: GTDH-A (3 alelos), G-6PDH-A (2 alelos), SKDH-A (3 alelos),  $\alpha$ -EST-A e B (3 alelos cada),  $\beta$ -EST-A e B (3 alelos cada), PGI-A (2 alelos), NDH-B (4 alelos), IDH-A e B (3 alelos cada), GOT-A (3 alelos), 6-PGDH-A (2 alelos) e MDH-B (2 alelos). Seis foram monomórficos: ADH-A, ME-A, 6-PGDH-B e C, MDH-A e C.

Os locos  $\alpha$ -EST-C,  $\beta$ -EST-C, PGI-B e C, NDH-A, IDH-C, GOT-B e C e MDH-D geraram zimogramas de difícil interpretação, devido à baixa resolução e/ou sobreposição de locos, apesar de vários fatores terem sido modificados para melhorar a resolução e separação dos locos e alelos. Por esse motivo, não foram incluídos nas estimativas das medidas de variabilidade.

Dos locos observados, 70 % foram polimórficos, com média de 2,25 de alelos por loco e de 3,21 alelos por loco polimórfico.

A heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) na população de imbuia foi de 0,186 e a heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) foi de 0,176. Observou-se que a heterozigosidade média observada ( $H_o = 0,186$ ) foi levemente superior a esperada ( $H_e = 0,176$ ), indicando um leve excesso de indivíduos heterozigotos na população.

Nas progênies, a heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) foi de 0,240, enquanto que a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) foi 0,217. Nota-se, portanto, o inverso do ocorrido na população: a heterozigosidade média observada ( $H_o = 0,217$ ) foi inferior a esperada ( $H_e = 0,240$ ), indicando excesso de homozigotos.

Na Tabela 2 encontram-se a freqüência e o teste de homogeneidade ( $\chi^2$ ) relativo aos heterozigotos observados e esperados na população e progênies de *Ocotea porosa*, do município de Colombo- PR.

TABELA 2: Frequência de heterozigotos observados e teste de  $\chi^2$  para os desvios das frequências para a população bem como para as progênes de *O. porosa* analisadas da procedência de Colombo – PR.

Sistema enzimático	População			Progênes		
	Observada	Esperada	$\chi^2$	Observada	Esperada	$\chi^2$
GOT-A	8,00	7,28	ns	220,00	228,13	ns
MDH-B	0,00	1,96	**	132,00	190,35	**
6 PGDH-A	13,00	10,36	ns	172,00	160,02	*

(\*\*)  $P < 0,010$ ; (\*)  $P < 0,050$ ; (ns) não significativo.

Analisando as frequências esperadas e observadas dos heterozigotos para o loco GOT-A, tanto na população como nas progênes, não se verificou desvio significativo, obedecendo, portanto, o equilíbrio de Hardy Weinberg. Desvios significativos foram, no entanto, observados para MDH-B ao nível de 1 %, tanto para a população quanto para as progênes. Já para 6-PGDH-A o desvio foi significativo a 5 % somente para as progênes, sendo não significativo para a população. Os resultados expressam as condições dos dados em que não foi realizada a análise de segregação em MDH-B e em 6-PGDH-A, a qual apresentou desvio significativo a 1 % para um número considerável de árvores.

### 3.1.3 Diversidade genética

As diversidades alélicas para cada loco e sua média para os locos encontram-se descritos na Tabela 3:

TABELA 3: Diversidade alélica na população de *O. porosa* localizada em Colombo – PR.

Loco	População
<i>GOT-A</i>	1,328
<i>MDH-B</i>	1,080
<i>6-PGDH-A</i>	1,514
<i>Média</i>	1,307

O loco PGM-A foi removido do cálculo, visto que apresentou valor indefinido para a análise através do programa GSED. Este fato pode ser devido à baixa variabilidade encontrado neste sistema – apenas um indivíduo heterozigoto dentre os 30 indivíduos analisados na população.

A maior diversidade foi encontrada no loco 6-PGDH-A, com a média mais alta entre os locos analisados ( $\nu = 1,514$ ). O valor encontrado em GOT-A foi pouco superior à média ( $\nu = 1,328$  e  $\nu = 1,307$ , respectivamente). Menor diversidade alélica foi encontrada no loco MDH-B ( $\nu = 1,080$ ), sendo o valor próximo de 1, indicando que quase não há variação nesse loco na população analisada.

### 3.1.4 Diferenciação entre progênies

A diferenciação genética entre as progênies, com base nas estatísticas-F de Wright (1965), estão descritos na tabela 4, sendo separados por loco analisado:

TABELA 4: Estatística-F para os três locos isoenzimáticos utilizados na análise de progênies de *O. porosa*.

Locos	$F_{st}$
GOT-A	0,1670
MDH-B	0,2878
6-PGDH-A	0,0422
Média	0,1719

Os valores estimados de  $F_{st}$  entre os locos estudados indicaram diferenciação genética média entre as progênies de 17,19% ( $F_{st} = 0,1719$ ), compreendendo valores variando de 4,22% (6-PGDH-A) a 28,78% (MDH-B). Portanto, a maior variabilidade genética encontra-se dentro das progênies (82,81%).

A diferenciação alélica ( $D_j$ ) nos locos estudados nas progênies é apresentada na Tabela 5.

TABELA 5: Diferenciação alélica ( $D_j$ ) e diferenciação alélica média ( $\delta$ ) nas progênies de *O. porosa*.

Progênies	$D_j$			Média
	GOT-A	Loco MDH-B	6-PGDH-A	
1	0,076	0,095	0,306	0,159
2	0,118	0,117	0,036	0,091
3	0,135	0,043	0,015	0,064
4	0,310	0,024	0,072	0,135
5	0,134	0,080	0,125	0,113
6	0,170	0,058	0,063	0,097
7	0,151	0,064	0,013	0,076
8	0,252	0,567	0,054	0,291
9	0,151	0,046	0,090	0,096
10	0,152	0,050	0,033	0,078
11	0,134	0,117	0,022	0,091
12	0,150	0,032	0,005	0,062
13	0,135	0,296	0,028	0,153
14	0,022	0,083	0,010	0,039
15	0,148	0,117	0,026	0,097
16	0,135	0,118	0,056	0,103
17	0,118	0,058	0,013	0,063
18	0,382	0,135	0,015	0,177
19	0,077	0,512	0,051	0,213
20	0,233	0,112	0,082	0,142
21	0,074	0,058	0,001	0,044
22	0,014	0,003	0,017	0,011
23	0,294	0,117	0,039	0,150
24	0,078	0,098	0,074	0,083
25	0,027	0,135	0,010	0,057
26	0,118	0,099	0,005	0,074
27	0,214	0,070	0,106	0,130
28	0,272	0,046	0,089	0,135
29	0,117	0,417	0,047	0,194
30	0,065	0,055	0,153	0,091
$\delta$	0,149	0,127	0,055	0,110

A maior média de diferenciação alélica, ou seja, de maior polimorfismo, foi encontrada em GOT-A ( $\delta = 0,149$ ), seguido de MDH-B ( $\delta = 0,127$ ) e 6-PGDH-A ( $\delta = 0,055$ ). As maiores diferenciações alélicas em GOT-A foram encontradas nas progênies dezoito (0,382), quatro (0,310) e vinte e três (0,294); em MDH-B na oito (0,567), dezenove (0,512) e vinte e nove (0,417) e em 6-PGDH nas progênies um (0,306), trinta (0,153) e cinco (0,125).

Dentro das progênies, a maior diferenciação alélica foi observada nas progênies oito, dezenove e vinte e nove (0,291; 0,213 e 0,194, respectivamente).

A diferenciação ( $\delta$ ) obtida considerando-se todas as progênies analisadas foi de 0,110. A progênie que apresentou menor valor de diferenciação alélica foi a de número vinte e dois, com  $D_j =$

0,011, indicando que esta progênie compartilha 98,9% de seus elementos genéticos com as demais progênies analisadas.

A diferenciação de cada progênie, nos locos isoenzimáticos analisados e no conjunto de todos os locos, encontra-se representada graficamente na Figura 1. Nesse diagrama em caracol, as progênies estão representadas por setores e o comprimento dos raios indicam os valores de  $D_j$  e os raios do círculo correspondem ao  $\delta$ .

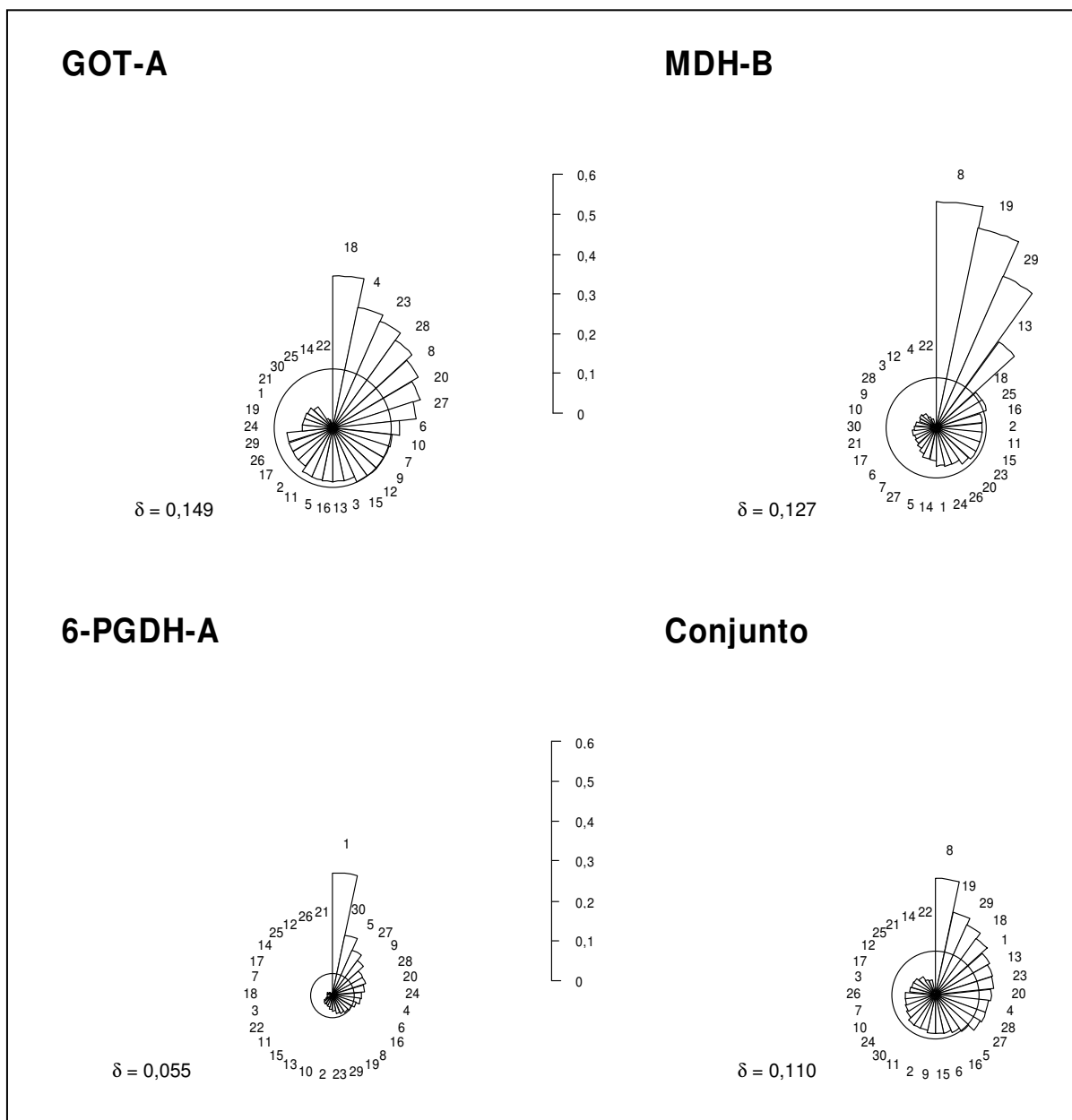


FIGURA 1: Diferenciação alélica ( $D_j$ ) entre os sistemas utilizados nas progênies de *O. porosa* representadas pelos diagramas em caracol. Os comprimentos dos raios indicam  $D_j$  e o raio do círculo é igual a  $\delta$  (diferenciação total).

## 3.2 Sistema reprodutivo

### 3.2.1 Viabilidade polínica e receptividade do estigma

Em teste preliminar, foi utilizada apenas uma antera por repetição. Entretanto o número de grãos de pólen encontrados foi insuficiente para a análise. Aumentando o número para três anteras, foi possível ter um número suficiente de grãos por repetição para a análise estatística.

A viabilidade do pólen diferiu entre as árvores testadas, sendo resumida na tabela abaixo:

TABELA 6: Porcentagem da viabilidade de pólen obtida através do uso de corante tetrazólio por árvore analisada de *O. porosa*.

Árvore	Médias (%)	Coefficiente de Variação
1	64,75	34,10
2	76,00	9,79
3	92,75	4,34
4	84,00	4,86
Média geral	79,38	19,11

A maior viabilidade foi encontrada para a árvore 3, com 92,75 % de grãos de pólen viáveis. A árvore 1 apresentou a menor média obtida (64,75 %), sendo seguida da árvore 2 (76 %) e da 4 (84 %). Em relação ao coeficiente de variação, o maior índice foi encontrado na árvore 1 (34,10). Este alto valor pode estar relacionado com a amostragem das anteras, a qual não diminuiu esse efeito nesta árvore.

Através do teste com peróxido de hidrogênio nos diferentes estágios de floração foi detectada protoginia (maturidade precedente do gineceu em relação ao androceu), apresentando receptividade após a abertura do botão floral. No início da receptividade o estigma apresentava coloração verde clara, sendo a primeira estrutura visualizada logo após a separação das sépalas. A queda da receptividade estigmática pôde ser detectada através da mudança de coloração, de verde clara (receptivo) a marrom (sem receptividade). Observações visuais demonstraram que com a senescência do estigma ocorre a liberação de pólen. As valvas se abrem e nessas ficam agrupados os grãos de pólen, numa pequena massa de coloração amarela em cada valva.

### 3.2.2 Polinizações controladas

Nas tabelas 7, 8 e 9 estão resumidos os dados obtidos nos testes de polinização controlada nos anos de 2004 e 2005.

TABELA 7: Polinizações controladas realizadas em *O. porosa* no ano de 2004 e número de flores testadas (NFL), número de frutos originados (NFR) e porcentagem por tratamento.

Tratamento	Árvore 1			Árvore 2			Árvore 3		
	NFL	NFR	%	NFL	NFR	%	NFL	NFR	%
Verificação de apomixia	30	0	0,00	31	0	0,00	34	0	0,00
Polinização aberta	203	1	0,49	292	0	0,00	405	5	1,23
Autopolinização espontânea	10	0	0,00	10	0	0,00	10	0	0,00
Autopolinização controlada	108	3	1,85	73	0	0,00	62	0	0,00
Polinização cruzada	101	3	2,97	38	0	0	104	1	0,96

TABELA 8: Resultados dos cruzamentos controlados efetuados em *O. porosa* em 2004, com o número de flores testadas (NFL), número de frutos originados (NFR) e porcentagem por árvore. Eixos: vertical - árvores receptoras de pólen; horizontal - árvores doadoras de pólen.

Receptoras \ Doadoras	Árvore 1			Árvore 2			Árvore 3		
	NFL	NFR	%	NFL	NFR	%	NFL	NFR	%
Árvore 1	-	-	-	24	0	0	37	0	0,00
Árvore 2	56	0	0,00	-	-	-	67	1	1,49
Árvore 3	45	3	6,67	14	0	0	-	-	-

TABELA 9: Polinizações controladas realizadas em *O. porosa* no ano de 2005 e número de flores testadas (NFL), número de frutos originados (NFR), após o período de 1 mês (NFR1), 2 meses (NFR2), 3 meses (NFR3) após polinizações e porcentagem de frutos originados por tratamento.

Tratamento	Árvore 1				
	NFL	NFR1	NFR2	NFR3	%
Verificação de apomixia	49	0	0	0	0,00
Polinização aberta	95	5	3	2	2,10
Autopolinização espontânea	118	0	0	0	0,00
Autopolinização controlada	44	0	0	0	0,00
Polinização cruzada	21	0	0	0	0,00
	Árvore 2				
	NFL	NFR1	NFR2	NFR3	%
Verificação de apomixia	36	0	0	0	0,00
Polinização aberta	142	13	7	5	3,52
Autopolinização espontânea	80	0	0	0	0,00
Autopolinização controlada	40	1	0	0	0,00
Polinização cruzada	63	3	0	0	0,00
	Árvore 3				
	NFL	NFR1	NFR2	NFR3	%
Verificação de apomixia	44	0	0	0	0,00
Polinização aberta	59	0	0	0	0,00
Autopolinização espontânea	83	0	0	0	0,00
Autopolinização controlada	11	0	0	0	0,00
Polinização cruzada	52	0	0	0	0,00



No ano de 2004, somente os tratamentos de autopolinização controlada, polinização cruzada e aberta originaram frutos (Tabelas 7 e 8), havendo baixa produção. O índice mais elevado foi encontrado no cruzamento da árvore um com a três (6,67 %).

Nos tratamentos conduzidos na árvore dois no primeiro ano e na árvore três no segundo, não houve formação de frutos, observando-se baixa formação no geral. Na verificação de apomixia e autopolinização espontânea não houve formação de sementes em ambos os anos.

No ano de 2005 somente em polinização aberta foram originados frutos, conforme descrito na Tabela 9. Em autopolinização controlada e cruzamento houve a formação de frutos, somente na árvore dois, os quais foram abortados após o primeiro mês de desenvolvimento.

Em autopolinização controlada no ano de 2004 somente a árvore um originou 3 frutos de 108 flores, e em 2005 apenas a árvore dois originou 1 fruto de 40 flores testadas, o qual foi abortado após o primeiro mês de formação.

### 3.3 Germinação de sementes das progênies da procedência de Colombo - PR

Após a emissão dos hipocótilos notou-se o aparecimento de indivíduos albinos em algumas progênies da procedência de Colombo. Das 30 progênies, 6 apresentaram indivíduos com esta característica. Estes apresentaram diversos padrões de albinismo, tais como indivíduos completamente sem pigmentação, alguns com manchas de clorofila (padrão mosaico), e outros ainda intercalando ausência e presença de clorofila em diferentes folhas ou dentro das mesmas. Na tabela abaixo estão as progênies que apresentaram indivíduos albinos, e sua porcentagem dentro das mesmas:

TABELA 10: Porcentagem de indivíduos albinos encontrados nas progênies de *O. porosa* da procedência de Colombo – PR.

Progênie	Indivíduos albinos (%)
26	23,4
11	16
18	7,1
24	3,1
23	2,9
17	1,9
Média	9,1
Média total das progênies	1,8

A maior porcentagem de indivíduos albinos foi encontrada na progênie vinte e seis (23,4 %), seguida pelas progênies onze (16 %) e dezoito (7,1 %), com menor índice encontrado na progênie dezessete (1,9 %).

#### 4. DISCUSSÃO

O grau de estruturação espacial entre os indivíduos de uma espécie em uma população depende da combinação de diversos fatores ecológicos, genéticos e reprodutivos.

Com relação aos fatores genéticos, a comparação das frequências alélicas dos adultos da população analisada e suas progênies, mostrou que o alelo mais freqüente nos adultos também foi o mais comum nas progênies, sugerindo equilíbrio entre esses dois grupos.

As frequências observadas apresentaram predominância de alelos, indicando que pode estar ocorrendo o processo de deriva genética, o qual pode levar a perda e fixação de alelos nessa população, decorrentes do processo de fragmentação florestal (Souza, 1997; Kageyama *et al.*, 1998).

Os valores encontrados para a porcentagem de locos polimórficos e números de alelos por loco no presente estudo são semelhantes aos descritos por Kageyama *et al.* (2003) para *O. odorifera*. Gibson & Whellwright (1995) encontraram valores inferiores em *O. tenera*.

Segundo Kageyama *et al.* (2003), os altos valores observados para *O. odorifera* podem estar associados a ampla distribuição geográfica da espécie e ao seu sistema reprodutivo, possivelmente de cruzamento. Os altos valores encontrados em *O. porosa* podem também estar relacionados a esses fatores, justificando a semelhança entre os resultados obtidos.

Os valores encontrados na diferença entre a heterozigosidade esperada e observada entre os adultos e progênies indicam que provavelmente esteja ocorrendo o favorecimento de polinização cruzada entre indivíduos mais próximos e aparentados entre si, além de autopolinização.

O excesso de heterozigotos observados na população adulta de imbuia poderia ser justificado também pela morte prematura dos indivíduos endogâmicos, através da seleção natural, devido à menor capacidade adaptativa e ao seu reduzido vigor, assim como encontrado para *Ilex paraguariensis* (Wendt, 2005).

Outra proposição que justifique o leve aumento da heterozigosidade observada nos indivíduos adultos é o fato de estes serem remanescentes ou terem sido originados de uma população melhor estruturada geneticamente, onde as condições para a reprodução eram mais favoráveis. Nesta época, a fragmentação florestal e a ação antrópica eram possivelmente menos acentuadas ou inexistentes.

Diversas podem ser as causas dos desvios entre as frequências observadas e esperadas de heterozigotos. Dentre estas pode-se destacar que as isoenzimas podem estar sendo controladas por mais de um loco, pode estar ocorrendo seleção, distorções meióicas, interações interalélicas, ligação com locos, alelos deletérios e erros de amostragem (Cheliak & Pitel, 1985; Strauss & Conkle, 1986), dentre outros.

De acordo com os valores de referência para diversidade alélica para os locos GOT-A e MDH-B, foram constatados baixos índices, indicando baixa diversidade. Já em 6-PGDH-A, o índice foi mais elevado possivelmente devido a maior frequência de heterozigotos.

O valor médio estimado de  $F_{st}$  para as progênies indicou que a variabilidade genética é maior dentro do que entre progênies. Estes dados sugerem que provavelmente tenha ocorrido polinização heterogênea dentro das árvores analisadas, decorrente de diversos fatores, tais como variação espacial e temporal entre as árvores na fenologia do florescimento e fecundidade (Mitton, 1992). A amostragem realizada provavelmente não conseguiu diminuir esses efeitos.

A diferenciação alélica entre os sistemas enzimáticos variou devido ao polimorfismo encontrado. Diferenças foram também encontradas entre progênies. As progênies mais diferenciadas podem ter sido resultantes de um fluxo gênico mais elevado que nas progênies menos diferenciadas.

Foram encontradas diferenças na viabilidade de pólen entre as árvores analisadas. Esse fato pode ser relativo a diferença na maturidade do pólen utilizado, além de fatores ambientais, genéticos e fisiológicos (Bots & Mariani, 2005). Estudos em diferentes espécies utilizando o tetrazólio como corante obtiveram médias semelhantes ao do presente estudo (Huang *et al.*, 2004; Bolat & Pirlak, 1999; Derin & Eti, 2001; Kaul *et al.*, 2005).

Nas polinizações controladas efetuadas, foi detectada baixa formação de frutos. Em todos os tratamentos conduzidos na árvore dois no primeiro ano e na árvore três no segundo, não houve formação de frutos. Este fato pode estar relacionado com a sazonalidade reprodutiva, onde as espécies produzem diferentes quantidades de frutos em determinados períodos. Diversos podem ser os fatores que influenciam a sazonalidade reprodutiva, tais como fatores fisiológicos (Primack, 1985), quantidade de nutrientes disponíveis no solo (Zagt, 1997) e, muitas vezes, quando a deficiência de

recursos é acentuada em função de frutificações anteriores, pode ocorrer um padrão supra-anual de frutificação (Flowerdew & Gardner, 1978).

No tratamento de polinização aberta, Crestana & Baitello (1988) descrevem em *N. mollis* valor próximo ao obtido em *O. porosa* (3,52 %). A frutificação em polinização aberta sugere que a mesma pode ocorrer por alogamia ou autogamia.

Na verificação de apomixia e autopolinização espontânea não houve formação de frutos em ambos os anos. No entanto, Crestana & Baitello (1988) obtiveram o índice de 0,37 % de frutos nos tratamentos de autopolinização espontânea em *N. mollis*. Estes fatos sugerem que *O. porosa* pode possuir mecanismos que evitem a autopolinização, tais como reações de autoincompatibilidade ou diferença temporal na maturação dos órgãos reprodutivos, o qual foi retratado através de observações visuais e do teste de receptividade estigmática.

Crestana & Baitello (1988) também não encontraram formação de frutos em cruzamentos controlados. No presente estudo a formação de frutos nesse tratamento se deu apenas no primeiro ano de observação na árvore um (2,97 %) e na três (0,96 %), sendo nulo no segundo ano.

Pouco se conhece sobre as causas dos processos abortivos de frutos e sementes. O aborto seletivo de frutos é característica registrada em espécies de Asclepiadaceae (Vieira & Shepherd, 1999). Em Lauraceae, foi evidenciado em *Persea americana* que pode ocorrer seleção genética na abscisão do fruto (Degani *et al.*, 1986). Em *O. porosa* o alto índice de aborto de flores encontrado não permitiu maiores conclusões sobre o sistema reprodutivo da espécie através de polinizações controladas.

A presença de plântulas albinas e cloróticas foi retratada na população estudada de *Cryptocarya moschata* por Moraes & Monteiro (2002), uma espécie da família Lauraceae. Segundo Finkeldey (1998), autofecundações e cruzamentos entre parentes causam endogamia, tendo efeitos negativos sobre a capacidade adaptativa e reprodutiva das populações, como perda de vigor e fertilidade.

## 5. CONCLUSÃO

1. O fluxo gênico na população estudada pode estar sendo reduzida, a julgar pelo excesso de homozigotos encontrados nas progênes;
2. Pelos resultados obtidos nos testes de polinização controlada é provável que a espécie apresente sistema misto de reprodução;
3. Os testes de polinização controlada sugeriram a presença de incompatibilidade;
4. A técnica de tetrazólio apresentou-se sensível para a detecção da viabilidade do pólen;

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. (1998) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 574 p.

BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. (1977) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research*. 27 (3): 415-424.

BERGMANN, F. (1991). Isozyme gene markers. Sauerländer's Verlag: Frankfurt am Main.

BERGMANN, F.; HATTEMER, H. H. (1998) Isozymes in forest genetics research. In: MANDAL, A. K., GIBSON, G. L. (Ed.) *Forest Genetics and Tree Breeding*. New Dehli: CBS Publishers & Distributors, p. 227-238.

BOLAT, I.; PIRLAK, L. (1999) An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. *Trk. J. of Agriculture and Forestry*. 23 (4): 383-388.

BOTS, M.; MARIANI, C. (2005) *Pollen viability in the field*. Radboud Universiteit Nijmegen, 53 p.

CARVALHO, P. E. R. (1994) *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Colombo: Embrapa – CNPq; Brasília, DF: Embrapa – SPI. 640 p.

CARVALHO, P. E. R. (2003) *Espécies Arbóreas Brasileiras. Volume 1*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas. 1039 p.

CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. (1985) Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. *Silvae Genetica* 34: 142-148.

CRESTANA, C. de S. M.; BAITELLO, J. B. (1988) Biologia floral de *Nectandra mollis* (H. B. K.) Nees ssp *oppositifolia* (Nees) Rohwer (Lauraceae) na Estação Experimental de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. Boletim Técnico do Instituto Florestal. 42: 121-137.

DEGANI, C.; GOLDRING, A.; GAZIT, S.; LAVI, U. (1986) Genetic selection during the abscission of avocado fruitlets. Hortscience 21 (5): 1187-1188.

DERIN, K.; ETI, S. (2001) Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. Tr. J. of Agriculture and Forestry. 25 (3): 169-173.

FINKELDEY, R. (1998) An Introduction to Tropical Forest Genetics. Lecture Notes. Georg-August University Göttingen, Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 241 p.

FLOWERDEW, J. R. & GARDNER, G. (1978) Small rodent population and food supply in a Derbyshire ashwood. Journal of Animal Ecology 47: 725-740.

FORFANG, A. S.; OLESEN, J. O. (1998) Male-biased sex ratio and promiscuous pollination in the diecious island tree *Laurus azorica* (Lauraceae). Plant Syst. Evol. 212: 147-157.

GIBSON, J. P.; WHEELWRIGHT, N. T. (1995) Genetic structure in a population of a tropical tree *Ocotea tenera* (Lauraceae): influence of avian seed dispersal. Oec. 103: 49-54.

GILLET, E. (1998) GSED: Genetic Structures from Eletrophoresis data. Version 1.1 User's manual. Institut Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen: Germany.

GOLDENBERG, R.; SHEPHERD, G. J. (1998) Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. Plant Syst. Evol. 211: 13-29.



GREGORIUS, H. R. (1978). The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Math. Biosciences* 41: 253-271.

GREGORIUS, H. R. (1984) Measurement of genetic differentiation in plant populations. In: GREGORIUS, H. R. (Ed.) *Populations Genetic in Forestry*. Springer-Verlag, berlin, Heidelberg, New York, Tokio, p. 276-285.

GREGORIUS, H. R. (1987) The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Th. App. Gen.* 74: 397-401.

GREGORIUS, H. R; ROBERDS, J. H. (1986) Measurement of genetical differentiation among subpopulations. *Th. App. Gen.* 71: 826-834.

HAMRICK, J. L. (1987) Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: *Differentiation patterns in higher plants*. Academic press, p. 53-67.

HERTEL, R. J. G. (1974) Estudos sobre *Phoebe porosa* (Nees) Mez II. A inflorescência, a flor e o fruto da imbuia. *Acta Biológica Paranaense*, v. 3, p. 25-53.

HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X. LIN, J. (2004) Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. *Ann. Bot.* 93: 295-301.

IBAMA. (1992) Portaria N° 37-N, de 3 de abril de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção.

KAGEYAMA, P. Y.; CUNHA, G. C. da; BARRETO, K. D.; GANDARA, F. B.; CAMARGO, F. R. A.; SEBBENN, A. M. (2003) Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Sci. Flor.* 64: 108-119.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. de. (1998) Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Série Técnica IPEF 12 (32): 65-70.

KAUL, M. K.; KUMAR, A.; SHARMA, A. (2005) Reproductive biology of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Current Science 88 (9): 1375-1377.

LIENGSIRI, C.; PIEWLUANG, C.; BOYLE, T. J. B. (1990) Starch gel eletrophoresis of tropical trees. A Manual. The ASEAN- Canada Forest Tree Seed Centre, Saraburi, 51 p.

LORENZI, H. (1992) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Volume 2. Nova Odessa: Plantarum.

MITTON, J. B. (1992) The dynamic mating systems of conifers. Pp. 197-216 in: W. T. ADAMS, S. H. STRAUSS, D. L.: COPES and A. R. GRIFFIN (Editors). Population Genetics of Forest Trees. Proc. Of the Int. Symp. On population Genetics of Forest Trees, Corvallis. Kluwer Dordrecht.

MORAES, P. L. R. de; DERBYSHIRE, M. T. V. de C. (2003) Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. Biota Neotropica 2 (2): 1-19.

<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/abstract?article+BN02402022002>

MORAES, P. L. R. de; MONTEIRO, R. (2002) Taxas de cruzamento em uma população natural de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). Biota Neotropica, 2 (2): 1-10.

<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n2/pt/abstract?article+BN01102022002>

MORAES, P. L. R. de; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. (2004) Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocaria moschata* Nees (Lauraceae). Rev. Br. Bot. 27 (3): 475-487.

NEI, M. (1975) Molecular population genetics and evolution In: NEUBERGER, A.; TATUM, E. L. (Ed.) *Frontiers of Biology*, v. 40. New York: American Elsevier.

NIESENBAUM, R. A. (1992) Sex ratio, components of reproduction, and pollen deposition in *Lindera benzoin* (Lauraceae). *Am. J. Bot.* 79 (5): 495-500.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. S. (2002) Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. *Rev. Br. Bot.* 25 (3): 331-338.

PRIMACK, R.B. (1985) Patterns of flowering phenology in communities, populations, individuals, and single flowers. In *The population structure of vegetation* (J. White, ed.). *Handbook of vegetation science*, Dr. W. Junk Publ., Dordrecht, 3: 571-593.

RESENDE, M. D. V de. DE; STURION, J.A.; CARVALHO, A.P. DE; SIMEÃO, R.M.; FERNADES, J.S.C. (2000) Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. Colombo: Embrapa Florestas. Circular Técnica, n. 43. 66 p.

SEOANE, C. E. S; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. (2000) Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). *Scientia Forestalis.* 57: 123-139.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. (2002) Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Silv. Gen.* 51 (5-6): 191-196.

SOUZA, L. M. F. I. (1997) Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hill (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. (1974) Pollen: biology, biochemistry, and management. Springer Verlag, New York, New York, USA.

STRAUSS, S. H.; CONKLE, M. T. (1986) Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone pine. *Theor. Appl. Genet.* 72: 483-493.

SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. (1997) BIOSYS-2: A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics. User's Manual. Department of Genetics and Development, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois: USA.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. P.; LIMA, J. C. A. (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE.

VIEIRA, M. F.; SHEPHERD, G. J. (1999) Sistema reprodutivo de *Oxypetalum appendiculatum* Mart. e *Oxypetalum banksii* Roem. & Schult. subsp. *banksii* (Asclepiadaceae). *Acta Botanica Brasílica* 13: 237-241.

WENDT, S. N.; SOUSA, V. A.; QUOIRIN, M.; STURION, J. A.; SANTOS E. C. S. (2003) Caracterização genética de populações naturais de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: Congresso Sul-americano da erva-mate, 3., 2003, Chapecó. Anais. [Chapecó]: EPAGRI, 2003. p. 1-8. 1 CD-ROM. Seção: Conservação, Melhoramento e Multiplicação. Feira do Agronegócio da Erva-mate, 1., 2003, Chapecó. Integrar para promover o agronegócio da erva-mate.

WENDT, S. N. (2005) Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

WRIGHT, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evol.* 19: 395-420.

ZAGT, R. J. (1997) Pre-dispersal and early post-dispersal demography, and reproductive litter production in the tropical tree *Dicymbe altsonii* in Guyana. *Journal of Tropical Ecology* 13: 511-526.

ZEISLER, M. (1938) Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. *B. Bot. Zen.* 58: 308-318.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectivas futuras, sugere-se testar novos tampões e sistemas para a técnica de isoenzimas em um número maior de árvores, visando obter maior número de locos polimórficos.

Para a confirmação dos resultados de herança e desequilíbrio de ligação obtidos recomenda-se testar um número maior de árvores nos sistemas enzimáticos estudados.

Recomenda-se estudar populações naturais de *Ocotea porosa*, em áreas sem ação antrópica.

Recomenda-se estudos sobre o sistema reprodutivo através da técnica de marcadores genéticos utilizando populações naturais como parâmetros para uma melhor compreensão da dinâmica populacional da espécie em remanescentes florestais.

Recomenda-se a realização de estudos básicos de biologia reprodutiva para a espécie abrangendo um número maior de árvores, preferencialmente em áreas sem ação antrópica. Dentre estes estudos, salienta-se os estudos de biologia floral e da ecologia da polinização, para o esclarecimento de diversos parâmetros importantes, tais como identificação de polinizadores e a verificação de incompatibilidade na espécie.

Em futuros testes de polinização controlada, recomenda-se o uso de um número maior de inflorescências, testando-se poucas flores dentro das mesmas devido às altas taxas de abortos de frutos. Recomenda-se, também, a seleção de indivíduos distantes geograficamente a fim de evitar o uso indivíduos aparentados, evitando-se possíveis barreiras de incompatibilidade.

Serão necessários novos estudos englobando outras técnicas de viabilidade de pólen para uma melhor compreensão da potencialidade do pólen.