

IPEF - ESALQ
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA
FORESTALIS

ISSN 1413-9324
Nº 53, Junho, 1998

Variabilidade genética, sistema reprodutivo
e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L.
através de marcadores isoenzimáticos

*Genetic variability, mating system and the spatial genetic structure in
Genipa americana* L. through isozyme markers

Alexandre Magno Sebbenn; Paulo Yoshio Kageyama;
Roland Vencovsky

RESUMO: O estudo genético de *Genipa americana* L., a partir da análise de eletroforese de isoenzimas permitiu a obtenção de 13 alelos distribuídos entre 8 locos, sendo 4 monomórficos e 4 polimórficos. Os índices de diversidade revelaram um baixo número de alelos por locos ($A = 1,63$) e uma média porcentagem de locos polimórficos ($P = 50\%$), igualmente para adultos e plântulas. A heterozigosidade média esperada (\hat{H}_e) foi alta para adultos e plântulas (0,182; 0,149, respectivamente), mostrando a população como potencial para a conservação *in situ*. O índice de (f) baixo e negativo para os adultos (-0,071) e alto e positivo para as plântulas (0,302), indicando equilíbrio de Hardy-Weinberg para os adultos, desvios de suas expectativas para as plântulas e seleção para heterozigotos entre a fase juvenil e adulta. A taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m) foi de 0,816, a unilocos (\hat{t}_s), de 0,617 e a diferenças $\hat{t}_m - \hat{t}_s$, de 0,199, revelando que em média, 81,6% das plântulas foram geradas por cruzamentos, sendo 61,7% de cruzamentos aleatórios e 19,9% de cruzamentos entre aparentados. A presença de acasalamentos endogâmicos sugere a existência de estruturação genética espacial na população. Contudo, as análises de autocorrelação espacial não revelaram estruturação estatisticamente significativa dentro da população. A diferença de $\hat{t}_m - 1,0$, foi de 18,4%, sugerindo a presença de apomixia, entretanto, Sebbenn (1997) usando o teste de χ^2 para detectar essa forma de reprodução, rejeitou tal hipótese.

PALAVRAS-CHAVE: Variabilidade genética; Sistema reprodutivo; Estrutura genética espacial; *Genipa americana*.

SUMMARY: The genetic variability, the mating system, apomixy and the spacial genetic structure of natural population of the tropical forest tree *Genipa americana* L. was studied using isoenzymes electrophoretic technics. Thirteen alleles distributed in eight locis were obtained in the research. Four of these loci were monomorphic and four were polymorphic. The average alele number per locis was 1,63 and the polimorphic locus percentage was 50% (99% probability) for both adults and progenies. The average estimated heterozigosity (\hat{H}_e) was high for adults (0,182) and for progenies (0,149). The Wright allelic fixation index (f) was negative for adults (-0,071) and positive for the progenies (0,320), suggesting desviation of heterozygote proportions

from Hardy-Weinberg expectation for the progenies, with probable endogamic mating and selection favoring the heterozygotes between the seedling and adult phase. The multilocus outcrossing rate (\hat{t}_m) and single locus outcrossing rate (\hat{t}_s), were 0,816 and 0,617, respectively, indicating that in this mating cycle 61,7% of the "plants progenies" analysed were generated from the mating of individuals not close related to each other, 19,9% by mating of related individuals $\hat{t}_m - \hat{t}_s$, and 18,4% probably by apomixy. However, the χ^2 test, designed to detect apomixy in the population (see Sebbenn, 1997), did not revealed it. The existence of endogamic mating suggest genetic structuration within population, but the spacial autocorrelation analyses did not detect statistically significant genetic structuration.

KEYWORDS: Genetic variability; Mating system; Spatial genetic structure; *Genipa americana*.

INTRODUÇÃO

O conhecimento dos níveis de variabilidade genética, forma de reprodução e de distribuição espacial dos genótipos dentro das populações são aspectos fundamentais quando se pretende a conservação *in situ* de uma espécie. A persistência de populações viáveis, do ponto de vista evolutivo das florestas tropicais, é crucial para a preservação dos ecossistemas tropicais e da diversidade biológica global (Liengsiri et al., 1995).

O sucesso de um programa de conservação genética depende diretamente dos níveis de variabilidade genética das populações de interesse. A estimativa da variabilidade genética em populações naturais é de fundamental importância para resolução de numerosos problemas no campo da biologia de populações (O'Malley e Bawa, 1987).

O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética ocorrem devido às interações de um conjunto complexo de fatores evolucionários, como variação no conjunto gênico; organização desta variação dentro de genótipos; distribuição espacial dos genótipos; sistema reprodutivo que controla a união dos gametas para a formação das progênies; dispersão das progênies; eventos casuais; e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem às populações futuras (Clegg, 1980).

A maioria dos estudos com espécies arbóreas tropicais tem mostrado altos níveis de variação isoenzimática dentro das populações, relativamente aos níveis de variação entre populações (Hamrick e Loveless, 1989; Stebbins, 1989; Hamrick e Godt, 1990). Para espécies arbóreas tropicais, Hamrick e Godt (1990), observaram que, em média, 82% da variabilidade genética total se concentra dentro das populações. Acredita-se que essa distribuição da variabilidade genética não seja aleatória, dada a limitada dispersão de pólen e sementes, bem como a seleção para micro habitats (Loveless e Hamrick, 1984).

Os padrões espaciais da estrutura genética intra-populacional são componentes fundamentais dos processos evolucionários e ecológicos em populações naturais de plantas (Brown, 1979). O conhecimento da estruturação genética permite determinar a intensidade ideal de amostragem, dentro das populações, para fins de conservação genética ou de cruzamentos (Epperson, 1990). A existência de estrutura genética espacial ou, em outras palavras, de indivíduos geneticamente correlacionados (aparentados), localizados próximos, dentro das populações, pode ser indicativo da existência de acasalamentos endogâmicos. Evidências indiretas de correlações genéticas entre plantas vizinhas têm sido obtidas de dados de

sistema de acasalamento (Dewey e Heywood, 1988). Nesse caso, plantas auto-incompatíveis que apresentem uma taxa de cruzamento menor do que 1,0 sugerem a existência de cruzamentos endogâmicos. É possível que as causas sejam a dispersão de pólen e sementes próximas à árvore matriz, resultando em estruturação familiar dentro da população.

Durante a década de 50, poucos foram os geneticistas que se utilizaram de marcadores genéticos para estudar o sistema de acasalamento em plantas. Atualmente essa metodologia tem crescido dentro da biologia de populações de plantas devido a duas causas: primeiro, a aplicação da eletroforese de isoenzimas tem fornecido numerosos marcadores genéticos que podem ser usados para medir o processo de transmissão genética entre plantas; segundo, modelos estatísticos mais elaborados têm sido introduzidos, permitindo uma descrição detalhada da transmissão genética entre gerações (Clegg, 1980). No entanto, poucas são as informações sobre o sistema de acasalamento de espécies arbóreas tropicais, sendo que o conhecimento dos métodos reprodutivos é essencial para a compreensão dos padrões de fluxo gênico e diferenciação genética entre e dentro de populações (Bawa, 1974; Clegg, 1980; O'Malley e Bawa, 1987; Hamrick, 1989; Kirkpatrick et al., 1990). O estudo detalhado do sistema reprodutivo das espécies arbóreas tropicais pode fornecer informações importantes sobre os padrões de acasalamento, a dinâmica dos processos microevolucionários e as melhores formas para conservação e manejo dessas essências (O'Malley e Bawa, 1987).

Entre as espécies arbóreas tropicais, cuja estrutura genética é adequada para representar espécies de dispersão hidrocórica, polinização entomofílica e adaptadas as matas ciliares, destaca-se *Genipa americana*. Devido às suas características adaptativas ao ambiente ciliar, combi-

nadas com o rápido crescimento e abundante produção de sementes, *G. americana* tem sido muito recomendada e utilizada na recuperação de áreas degradadas (Durigan e Nogueira, 1990).

Este estudo visa caracterizar geneticamente uma espécie arbórea tropical típica de matas ciliares, *Genipa americana* L., objetivando mais especificamente:

- a) quantificar a variabilidade genética da população;
- b) estudar o sistema reprodutivo da espécie e,
- c) estudar a distribuição espacial dos genótipos na população.

MATERIAL E MÉTODOS

A espécie Genipa americana L.

Genipa americana L. (Rubiaceae) distribui-se naturalmente entre as latitudes 20°N (México) e 20°S (Brasil, em São Paulo) (Carvalho, 1994). Apresenta uma altura média de 8 a 14 metros, DAP de 49 a 60 centímetros (Lorenzi, 1992), podendo atingir até 25 metros de altura e 90 centímetros de DAP (Carvalho, 1994). A planta é heliófita, seletiva, higrofila, característica de florestas pluviais e semidecíduas situadas em várzeas úmidas e brejosas (Lorenzi, 1992). A dispersão dos frutos ocorre por gravidade, zoocoria e hidrocoria (Crestana, 1993; Carvalho, 1994). A espécie é dióica (Crestana, 1993; Bawa et al., 1985) e a polinização é entomofílica, efetivada por mamangavas *Bombus morio* e *Epicharis rustica flava* (Crestana, 1993). No processo sucecional a espécie é considerada secundária tardia, com características de clímax (Carvalho, 1994). Sua distribuição é comum nas matas ciliares, onde suporta longos períodos de imersão, durante a época de cheia dos rios (Nilsson, 1989; Durigan e Nogueira, 1990).

Local de Estudo

O estudo foi realizado em uma população natural de *G. americana*, localizada em mata ciliar do Rio Moji Guaçu, pertencente à Estação Experimental de Moji Guaçu, do Instituto Florestal de São Paulo. A mata situa-se entre as coordenadas 22°16' S. e 47°11' W. G., em altitude média de 600 m. Os solos estão classificados nos tipos LVa e LE (Crestana, 1993). Esses solos de planície de inundações (hidromórficos) estão sujeitos a alagamentos periódicos nas épocas de cheias do rio (Mantovani et al., 1989; Nogueira, 1989). O clima é do tipo Cwa, caracterizado como úmido e mesotérmico, com variação na temperatura média mensal de 14,30°C a 24,65°C, segundo classificação Köppen (1948). A estação seca, segundo Crestana (1993), prolonga-se de maio a agosto, com 86,18% da precipitação (1314mm anuais) concentrados nos meses chuvosos (setembro a abril). A mata ocupa cerca de 7,2 ha da Estação Ecológica de Moji Guaçu, sendo remanescente da Bacia Hidrográfica Mogiana (Crestana, 1993).

Eletroforese de Isoenzimas

A análise de eletroforese de isoenzimas utilizou tecidos folhares de 42 plantas adultas (27 femininas e 15 masculinas) e de 300 plântulas, originadas de 15 matrizes (20 plântulas por matriz). As 15 matrizes que deram origem às plântulas estão incluídas nas 27 plantas femininas genotipadas. A eletroforese de isoenzimas foi horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%. As "corridas" foram realizadas em geladeira, com temperatura de 5°, segundo metodologia proposta Harris e Hopkinson (1976), Cheliak e Pitel (1981) e Alfenas et al. (1991). A extração das enzimas utilizou aproximadamente 20mg de tecido de limbo foliar, 10mg de areia lavada, 7mg de Polyvinyl Pirrolidone (PVP 40),

7mg de Polyvinyl Pirrolidone (PVP-360) e 200 microlitros de solução de extração número 1 de Alfenas et al. (1991, p.41) modificada pela ausência de 2 Mercaptoetanol. A solução, extraída foi absorvida em pedaços de papel de filtro (Whatman n° 3) e, posteriormente, submetida ao processo de eletroforese. Cada gel acondicionou amostras de 20 indivíduos. As receitas e os procedimentos de revelação das enzimas podem ser encontradas em Sebbenn (1997). Os sistemas enzimáticos utilizados foram: Xiquinato desidrogenase (SKDH), Fosfatase ácida (ACP), Fosfoglucoase (PGM), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), Fosfoglucoase isomerase (PGI), Malato desidrogenase (MDH), β-esterase (β-EST) e Peroxidase (PRX). O tampão de cuba e gel foi o Tris-citrato pH 7,5, descrito em Alfenas et al. (1991).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variabilidade Genética

As freqüências alélicas e os índices de diversidade genética como heterozigosidade média observada (H_o), heterozigosidade média esperada (\hat{H}_e) segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, número médio de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos (P) e índices de fixação de Wright (\hat{f}), foram estimados para plantas adultas e plântulas de *G. americana* pelo programa BIOSYS-1, desenvolvido por Swofford e Selander (1989). A heterozigosidade média observada foi calculada pela expressão: $H_o = 1 - \sum P_{ii}$, onde: P_{ii} = freqüência dos genótipos homozigotos. A heterozigosidade média esperada foi obtida pela expressão $\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$, sendo: p_i = freqüência alélica estimada do iésimo alelo, segundo expectativas de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987). P foi obtido pela média aritmética do número de alelos por locos, considerando-se como polimórfico o loco em

que a frequência do alelo mais comum não ultrapassasse 99%. A foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. O Índice de Fixação de Wright (\hat{f}) foi estimado ao nível de locos e média entre locos, segundo Vencovsky (1994). A significância estatística de \hat{f} foi dada ao nível de loco, pelo teste de $\chi^2 = N \hat{f}^2 (k-1)$, com $GL = [k(1-k)]/2$, onde: N = tamanho total da amostra e k = número de alelos (Li e Horvitz, 1953). Para a significância da média entre os locos, usou-se o teste $z = (\hat{f} - 0) / \hat{\sigma}_{\bar{x}}$, onde: \hat{f} = média de \hat{f} entre os locos, $\hat{\sigma}_{\bar{x}}$ = desvio ou erro padrão da média ($\sqrt{\hat{\sigma}_{\hat{f}} / n}$, sendo n o número de observações), de acordo com Loiselle et al. (1995). Se $z \geq 1,96$ ou $2,58$, a média será diferente de zero, a um intervalo de confiança de 95 ou 99% de probabilidade, respectivamente.

Sistema Reprodutivo

O sistema reprodutivo foi estudado pela taxa de cruzamentos unilocos (\hat{t}_s) e multilocos (\hat{t}_m), através do programa MLT ("Multilocos") de Ritland (1990), baseado no modelo de acasalamento misto de Ritland e Jain (1981). O modelo assume que as plântulas resultam de uma mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundação, cujas pressuposições básicas são: (1) que o conjunto de pólen é homogêneo para o cruzamento com todos os genótipos maternos; (2) que os alelos de diferentes locos segregam independentemente; (3) que os locos não são afetados pela seleção ou mutação, entre o tempo de acasalamento e a análise, e (4) que os locos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Clegg, 1980; Ritland e Jain, 1981; Ritland, 1990; Murawski et al., 1994). A estimativa do erro padrão da taxa de cruzamento multilocos, para a população, foram realizadas através de "bootstrap", sendo a unidade de re-amostragem, as plantas dentro das famílias. Utilizou-se 1000 reamostragens dentro das famílias, conforme

Murawski *et al* (1994). Diferenças positivas entre \hat{t}_m e \hat{t}_s ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), decorrem de acasalamentos entre aparentados (Shaw e Allard, 1982; Ritland e El-Kassaby, 1985; Ritland, 1990). A diferença entre \hat{t}_m e 1,0 fornece a proporção de autofecundação (\hat{s}) (Ritland, 1990). O teste de adequação dos dados ao modelo multilocos foi realizado a partir da estimativa de divergência entre populações, \hat{F}_{ST} de Wright (1965), comparando-se as frequências alélicas dos óvulos e do pólen, óvulos e indivíduos adultos femininos e entre as famílias. A significância de, para cada loco, foi dada pelo teste de $\chi^2 = 2N \hat{F}_{ST}^2 (k-1)$, $GL = (k-1)(s-1)$, onde: N = tamanho médio da amostra, K = número de alelos e s = número de populações (Workman e Niswander, 1970).

Estrutura Genética Espacial

O estudo da estrutura genética espacial na população, foi realizado pela análise de autocorrelação espacial, conforme Sokal e Oden (1978a, b) e Dewey e Heywood (1988), utilizando-se o programa "Autocorr", confeccionado por Jonh S. Heywood. Como a população em estudo encontrou-se dividida em duas subpopulações, a análise de auto-correlação foi feita separadamente, para cada uma das unidades, através dos locos polimórficos detectados nos indivíduos adultos. A análise de autocorrelação considera cada alelo (p_i) como uma variável; assim, cada genótipo homozigoto recebe o valor de $p_i = 1,0$, o heterozigoto $p_i = 0,5$, e quando o alelo está ausente $p_i = 0,0$. O número de alelos analisados por loco corresponde a $n-1$, onde n é o número de alelos, portanto, em um loco com dois alelos, apenas um foi avaliado, já que o outro tem frequência dependente deste. O método de autocorrelação utilizado foi o de comparações dentro de classes de distâncias preestabelecidas. Prestabeleceram-se 4 classes de distâncias na subpopulação 1, e 7 classes na subpopulação 2, objetivando um número de conexões mínimas em torno de 30.

RESULTADOS

A análise dos sistemas de coloração *in vitro* permitiu a interpretação dos sistemas isoenzimáticos 6PGDH, PGI, PGM, MDH e PRX. A interpretação dos zimogramas foi coerente com os padrões encontrados em trabalhos similares, sendo que as cinco enzimas interpretadas apresentaram os seguintes padrões: 1. Fosfoglucomutase (PGM): revelou uma região com atividade enzimática, formada por um loco monomórfico, com um alelo fixado; 2. 6-fosfogluconato: Desidrogenase (6PGDH): apresentou duas zonas de atividade, sendo a mais catódica, variável e inconstante, por isso, desprezada da interpretação, e a mais anódica formada por um loco polimórfico e multialélico (3 alelos), constituída por uma enzima monomérica; 3. Fosfoglucoase Isomerase (PGI): revelou duas zonas distintas de atividades (locos), sendo a mais catódica interpretada como um loco monomórfico com apenas um alelo (fixado) e a mais anódica, por um loco polimórfico contendo duas subunidades (dímera); 4. Malato Desidrogenase (MDH): revelou três zonas de atividades, sendo a

mais catódica e a intermediária interpretadas como dois locos polimórficos formados por enzimas monômeros, contendo 2 alelos, e a mais anódica interpretada como um loco monomórfico, apresentando apenas um alelo, fixado; 5. Pero-xidase (PRX): revelou três zonas de atividade, duas positivas e uma negativa, porém, devido à inconstância da revelação, só foi possível considerar uma zona de atividade, a mais catódica sendo interpretada como um loco monomórfico. Assim, obtiveram-se 13 alelos distribuídos em 8 locos, sendo 4 polimórficos e 4 monomórficos (Tabela 1). As frequências alélicas variaram de uma completa fixação, como no caso do alelo 1, dos locos Pgm-1, Pgi-1, Mdh-3 e Prx-2, igualmente nos adultos e nas plântulas, até frequências muito baixas, como no caso dos alelos 3, no loco 6Pgdh-1 (0,061), 2 nos locos Mdh-1 e Mdh-2 (0,023 e 0,042, respectivamente) nas plântulas.

Os índices de diversidade (Tabela 2), mostram um número médio de alelos por locos (A), baixo para ambos, adultos e plântulas ($1,63 \pm 0,26$) quando se consideraram todos os locos (monomórficos e polimórficos). A proporção de locos polimórficos (P) foi de 50%, tanto para adultos como para plântulas. A heterozigosidade média observada (H_o) foi alta para os adultos (0,195) e relativamente baixa para as plântulas (0,105). A heterozigosidade

Tabela 1

Frequências alélicas e tamanho da amostra (n) em população de adultos e plântulas de *G. americana*, para 8 locos isoenzimáticos.

Allele frequency and sample size in population of adult and seedlings of G. americana, in 8 loci isozime.

	Alelos	Pgm-1	6Pgdh-1	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-1	Mdh-2	Mdh-3	Prx-2
Adultos	1	1,000	0,329	1,000	0,464	0,905	0,893	1,000	1,000
	2	0,000	0,524	0,000	0,536	0,095	0,107	0,000	0,000
	3	0,000	0,146	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	n	42	42	42	42	42	42	42	42
Plântulas	1	1,000	0,441	1,000	0,507	0,973	0,958	1,000	1,000
	2	0,000	0,489	0,000	0,493	0,023	0,042	0,000	0,000
	3	0,000	0,061	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	n	294	255	280	298	275	289	256	273

Tabela 2

Índices de diversidade intrapopulacionais em adultos e plântulas de *G. americana*.

Intrapopulation diversity index in adult and seedlings of G.americana.

	Adultos	Plântulas
A	1,63 (0,26)	1,63 (0,26)
P (0,99)	50,0 %	50,0%
N	41,8 (0,2)	277,5 (5,7)
Ho	0,195 (0,068)	0,105(0,055)
\hat{H}_e	0,182 (0,054)	0,149 (0,083)

Tabela 3

Índices de fixação de Wright em adultos e plântulas de *G.americana*.

Wright fixation index in adult and seedlings of G.americana.

	Adultos	Plântulas
\hat{f} 6Pgdh-1	0,139 ns	0,447 **
Pgi-2	-0,292 ns	0,208 **
Mdh-1	-0,105 ns	-0,028 ns
Mdh-2	-0,120 ns	-0,043 ns
Média	-0,071 (0,077) ns	0,302 (0,092) **

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. O \hat{f} , ao nível de loco, foi testado a partir de Li e Horvitz (1953), e a média pelo teste Z.

média esperada (\hat{H}_e) foi alta para ambos os adultos (0,182) e as plântulas (0,149).

Os índices de fixação de Wright (\hat{f}), obtido para adultos (Tabela 3), foram médios e não diferentes de zero para todos os locos, com valores negativos para os locos Pgi-2, Mdh-1, Mdh-2 e para a média. Para as plântulas, os índices de fixação foram altos, positivos e significativamente diferentes de zero para os locos 6Pgdh-1, Pgi-

2 e média e, baixos, negativos e não diferentes de zero para os locos Mdh-1 e Mdh-2.

O teste de aderência dos locos ao modelo multilocos (Tabela 4), revelou diferenças significativas entre as frequências alélicas dos óvulos e do pólen, para os locos 6Pgdh-1, Pgi-2 e Mdh-2, indicando que 75% dos locos não se adequaram ao modelo de acasalamento misto de Ritland e Jain (1981).

Tabela 4

Estimativas de máxima verossimilhança das frequências alélicas do conjunto de óvulos e pólen e teste de χ^2 para aderência dos locos ao modelo multilocos.

Maximum likelihood estimates of gene frequencies in the pollen and ovule pools and chi-squares tests for fit to the multilocus.

Loco	N	Alelo	GL	Pólen	Óvulos	χ^2 (multilocos)
6Pgdh-1	187	1		0,378	0,455	61,10 **
		2		0,513	0,500	
		3	9	0,109	0,045	
Pgi-2	231	1		0,434	0,545	8,50 **
		2	1	0,566	0,455	
Mdh-1	197	1		0,988	1,000	0,00 ns
		2	1	0,012	0,000	
Mdh-2	215	1		0,925	0,955	17,23 **
		2	1	0,075	0,045	

Tabela 5

\hat{F}_{ST} e χ^2 para diferenças nas frequências alélicas entre pólen e óvulos, sexos, óvulos das plântulas e plantas adultas femininas e heterogeneidade do pólen nos cruzamentos em *G. americana*.

\hat{F}_{ST} and χ^2 for allele frequency divergence among pollen and ovule pools, sexes, seedlings ovule and feminine adult plants and pollen heterogeneity in outcrossing in *G. americana*.

Locos	Pólen x Óvulos		Masculinos x Femininos		Óvulo x femininas		Heterogeneidade do pólen	
	χ^2		χ^2		χ^2		χ^2	
6Pgdh-1	0,004	2,99 ns	0,028	2,30 ns	0,005	2,19 ns	0,240	188,16 **
Pgi-2	0,012	5,44 **	0,003	0,13 ns	0,010	2,14 ns	0,134	58,69 **
Mdh-1	0,006	2,36 ns	0,013	0,55 ns	0,037	8,61 **	0,023	9,75 **
Mdh-2	0,004	1,72 ns	0,026	1,09 ns	0,003	0,75 ns	0,014	6,048 *
Média	0,007	(0,002) **	0,018	(0,006) **	0,009	(0,007) ns	0,180	(0,053) **

** $P \leq 0,01$; a: teste de χ^2 (Workman e Niswander, 1970); b: teste Z.

De acordo com o teste de divergência entre frequências alélicas (\hat{F}_{ST}), estes desvios foram causados pela heterogeneidade nas frequências alélicas dos óvulos e do pólen (Tabela 5), com valores baixos e estatisticamente diferente de zero todos os locos, indicando que o conjunto de pólen que contribuiu para os acasalamentos não foi aleatório.

A taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m) estimada por família (Tabela 6) variou de 0,10 a 1,68 e a taxa de cruzamento média da população foi de 0,816 (0,051). A taxa de cruzamento unilocos (\hat{t}_s) variou, entre locos, de 0,181 (Mhd-1) a 1,047 (Pgi-2), com média de 0,617. Essa grande variação entre locos está refletida na magnitude do desvio padrão da média de (0,166). A diferença entre \hat{t}_m e \hat{t}_s foi de 0,199 e a diferença entre \hat{t}_m e (\hat{s}) 1,0 foi de 0,184.

As análises de autocorrelação espacial, mostradas nas Figuras 1 e 2, pela média de todos

Tabela 6

Estimativas da taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m), unilocos (\hat{t}_s), aparente (\hat{t}_a) e possível apomixia (\hat{s}) em famílias e população de *G. americana*.

*Outcrossing rate multilocus (\hat{t}_m), single (\hat{t}_s), apparent (\hat{t}_a) estimative and possible apomixy (\hat{s}) in family and population of *G. americana*.*

	1	1,66
	2	1,68
	3	1,02
	4	1,33
Taxa de cruzamento famílias	5	1,09
	6	0,60
	7	0,10
	8	1,18
	9	1,51
	10	1,59
	11	0,18
	6Pgdh-1	0,800(0,080) ¹
Taxa de cruzamento unilocos	Pgi-2	1,047(0,094)
	Mdh-1	0,181(0,166)
	Mdh-2	0,439(0,119)
	(\hat{t}_m)	0,816(0,051)
	(\hat{t}_s)	0,617(0,166)
População	($\hat{t}_m - \hat{t}_s$)	0,199
	(\hat{s})	0,184

1: erro padrão da taxa de cruzamento.

alelos dentro das subpopulações, mostraram que os valores do índice I de Moran, por classe de distância, nas duas sub-populações, oscilaram de positivos a negativos, fluando sempre em torno do valor zero, sugerindo aleatoriedade na distribuição dos genótipos dentro da população.

Figura 1

Correlograma para a média dos locos, em quatro classes de distâncias, na subpopulação 1 de *G. americana*.

Correlograms of mean loci in four class of distance in subpopulation 1 the G. americana.

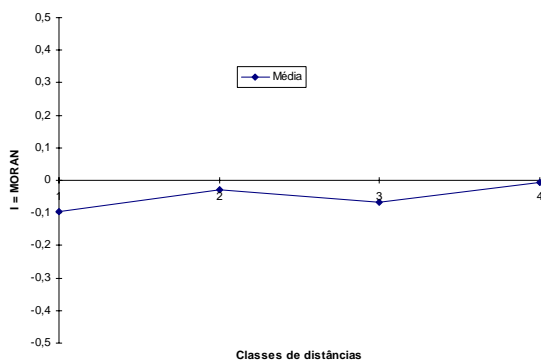
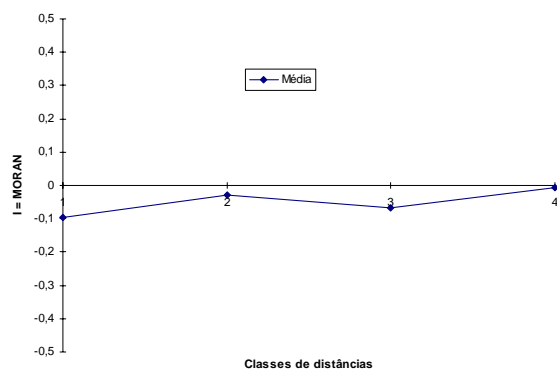


Figura 2

Correlograma para a média dos locos, em sete classes de distâncias, na subpopulação 2 de *G. americana*.

Correlograms of mean loci in seven class of distance in subpopulation 2 the G. americana.



DISCUSSÃO

Variabilidade Genética

A análise das freqüências alélicas da população de *G. americana* não mostrou ausência de alelos entre plântulas e indivíduos adultos. As diferenças observadas entre adultos e plântulas, nos locos 6Pgdh-1, Pgi-2, Mdh-1 e Mdh2, provavelmente decorram do fato de que as freqüências nas plantas adultas não estão diretamente relacionadas às plântulas, devido à amostragem realizada nos adultos incluir 27 indivíduos a mais do que as 15 matrizes que deram origem às plântulas (matrizes). Por outro lado, tais diferenças podem estar associadas a outros fatores, como seleção entre a fase de plântula e a fase adulta e/ou deriva genética advinda da amostragem não representativa do evento reprodutivo que deu origem às plântulas.

A variabilidade dentro de locos, medida pelo número de alelos por locos (A), revelou uma baixa riqueza alélica. Deve-se considerar que esta estatística foi estimada a partir de todos os locos (monomórficos e poli-mórficos). Segundo Nei (1987), esta estatística é muito influenciada pelo tamanho da amostragem genética (número de locos), por isso não é uma boa medida de variabilidade genética para comparação entre amostras de tamanhos diferentes. Já a variação entre locos, medida pela proporção de locos polimórficos (P), revelou um polimorfismo relativamente alto para a população, quando comparado com outros estudos. Hamrick et al. (1979), encontraram um P médio de 36,8% para espécies vegetais. Hamrick e Godt (1990) encontraram um P de 50%, também para espécies vegetais. Hamrick e Loveless (1986), encontraram um P de 89,3% para *Aletris blackiana* e 49,5% para *Psychotria horizontalis* (ambas, espécies da família Rubiaceae). Contrastando-se A e P, pode-se considerar que o polimorfismo em *G. americana* é maior entre locos (P) do que dentro de locos (A), ou seja, tem-se uma maior variabilidade genética por iso-

enzimas entre locos (maior número de locos polimórficos) do que dentro de locos (número de alelos).

Os níveis de heterozigosidade observada ($H_o = 0,195$; $H_e = 0,105$) e esperada ($\hat{H}_e = 0,182$; $\hat{H}_e = 0,149$) para adultos e progênies, respectivamente, foram altos. Estes valores também se acham na média dos estudos com espécies arbóreas tropicais. Hamrick et al., (1979), encontraram um \hat{H}_e de 0,141 para a média de espécies vegetais. Hamrick e Godt (1990) obtiveram valores de \hat{H}_e de 0,149 para a média de espécies arbóreas e 0,109 para arbóreas tropicais. Hamrick e Lovelless (1989), estimara \hat{H}_e para espécies arbóreas tropicais, da família Rubiaceae, de alta densidade de 0,374 para *Alseis blachiana*, 0,152 para *Psychotria horizontalis* e de 0,211 para a média de 16 espécies comuns. Moraes (1993), estudando plântulas de *Miracrodium urundeuva* (espécie dióica), em duas populações, obteve H_o de 0,140 e 0,160, respectivamente. Fica claro que as heterozigosidades aqui encontradas, comparativamente a estes estudos, indicam que a variabilidade genética de *G. americana* encontra-se dentro dos padrões médios de outras espécies vegetais tropicais com algumas características semelhantes. Os níveis de heterozigosidade detectados para a espécie são altamente relevantes para a conservação *in situ*, visto o grande número de novas recombinações genotípicas possíveis de ocorrer, mantendo assim o potencial evolutivo da espécie, às adaptações às prováveis mudanças ambientais e à colonização de novas áreas. Este resultado também mostra que a população apresenta potencial para a exploração em futuros programas de melhoramento e para a coleta de sementes com fins de recuperação de áreas degradadas.

Contrastando-se as heterozigosidades entre adultos e plântulas, observa-se que H_o foi superior nos adultos relativamente a \hat{H}_e , e inferior nas plântulas, revelando um excesso de heterozigotos para os adultos e de homozigotos para as plântulas, indicando a presença de

endogamia nas plântulas, e a possível existência de seleção em favor dos heterozigotos, entre a fase de plântula e a fase adulta. Em concordância, o índice de fixação (\hat{f}), médio entre locos, para os adultos mostrou um pequeno excesso de heterozigotos, porém, não estatisticamente diferentes de zero, sugerindo que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Caso a população se mantenha em EHW, teoricamente não ocorrerão perdas de variabilidade genética e o padrão de variabilidade será o mesmo por infinitas gerações. Atente-se para o fato de que este é um conceito teórico, em que a população não sofre evolução, porém, dificilmente essa situação acontece na natureza, devido aos fortes fatores evolucionários e ambientais a que estão sujeitos os organismos. Para as plântulas o \hat{f} mostrou um excesso significativo de homozigotos, indicando que as frequências gênicas observadas se desviam das esperadas, segundo os pressupostos do EHW. Desvios do EHW implicam que a população está subdividida reprodutivamente em grupos com um certo grau de parentesco (Futuyma, 1992). Possivelmente a subdivisão esteja associada à existência de estruturação familiar dentro da população, ou a acasalamentos preferenciais.

Os altos níveis de fixação alélica nas plântulas comparados com os baixos e até negativos índices nos adultos, confirmam a hipótese de seleção em favor dos heterozigotos, observada pelas heterozigosidades. Concordantemente, Murawski (1995), comparando \hat{f} entre adultos e plântulas em várias espécies arbóreas tropicais, observou, igualmente como aqui, seleção para heterozigotos entre a fase de plântula e a adulta. A seleção dá a entender que os acasalamentos, na população de *G. americana*, geram uma grande quantidade de sementes endogâmicas a cada ciclo reprodutivo, mesmo se considerando que as plantas adultas contenham alta heterozigosidade e estejam em EHW. A seleção natural elimina as sementes endogâmicas, favorecendo o desenvolvimento dos heterozigotos.

Provavelmente, trata-se de uma estratégia adaptativa da espécie favorecendo indivíduos mais variáveis, garantindo assim a manutenção dos níveis de heterozigosidade da população. No entanto, atente-se para o fato de que Lepsch-Cunha (1996), estudando *Cou-ratari multiflora*, na Amazônia, e Murawski et al. (1994), estudando *Shorea congestiflora*, no Siri Lanka, encontraram valores de \hat{f} maiores na fase adulta, relativamente à fase de plântula, mostrando que existem desvios dessa tendência (seleção em favor de heterozigotos) e indicando a necessidade de mais estudos sobre esse processo evolucionário.

Sistema Reprodutivo

A análise de adequação dos dados ao modelo de acasalamento misto (Ritland e Jain, 1981) revelou desvio do modelo. Segundo Ritland e El-Kassaby (1985), esses desvios não prejudicam as estimativas da taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m) e unilocos (\hat{t}_s), mas indicam a existência de outros fatores atuando no processo, como por exemplo, cruzamentos preferenciais e/ou entre aparentados. Murawski et al. (1990) estimaram \hat{t}_m e \hat{t}_s para *Cavanillesia platanifolia* e *Quararibea asterolepis*, a partir de locos com desvios significativos do modelo multilocos. Murawski et al. (1994) estimaram \hat{t}_m para *Shorea congestiflora* a partir de 6 locos isoenzimáticos e para *S. trapezifolia*, através de 2 locos, desconsiderando seus desvios do modelo. Um dos fatores mais comuns que leva a esses desvios é a heterogeneidade nas frequências alélicas dos óvulos e do pólen (Reis, 1996). Aqui neste estudo, conforme os resultados apresentados (Tabela 5), os desvios foram causados pela heterogeneidade do pólen nos cruzamentos, ou seja, o pólen que contribuiu para a formação das plântulas não era decorrente de uma amostra representativa do pólen da população, mas sim, advindo sistematicamente das mesmas plantas. A heterogeneidade do pólen implica em que as famílias receberam pó-

len diferenciado nos cruzamentos, resultando em acasalamientos preferenciais na população. Consideram-se cruzamentos preferenciais aqueles entre plantas com características fenotípicas semelhantes. Esta distribuição não aleatória do conjunto de pólen vai de encontro a um dos pressupostos básicos do modelo de Ritland e Jain (1981), podendo contribuir para desvios na estimativa de \hat{t}_m . Os acasalamentos preferenciais podem estar associados à visita do polinizador às árvores próximas, ao assincronismo no florescimento de plantas masculinas e femininas (Crestana, 1993), ou ainda à existência de estruturação espacial na população, gerando endogamia.

A análise do sistema reprodutivo de *G. americana* pela estimativa da taxa de cruzamento multilocos (Tabela 6), mostrou que a espécie se reproduz preferencialmente por cruzamento, o que era esperado, dado que a espécie é dióica. A taxa de cruzamento para as famílias revelou endogamia e/ou apomixia em alguns cruzamentos (apomixia porque a espécie é dióica, portanto, não pode autofecundar-se). Esta discrepância nas taxas de cruzamentos com algumas famílias, com valores iguais ou acima de 1,0, e outras com valores próximos a 0,20, provavelmente também está associada ao assincronismo na floração masculina e feminina. É de se supor que as matrizes de número 6, 7 e 11, que apresentaram menores valores para \hat{t}_m , floresceram no início ou no fim do pico da floração masculina da população, fase em que havia menos pólen disponível para os acasalamentos, o que reduziu a produção de sementes por cruzamentos, assim possibilitando a ocorrência de reprodução apomítica. Infelizmente, esta suposição não pode ser confirmada aqui neste estudo, dado que não houve um acompanhamento fenológico durante a floração que deu origem às plântulas. Ainda, como nenhuma das três matrizes anteriormente mencionadas estava isolada, descarta-se a possibilidade de que as baixas taxas de cruzamentos sejam devido ao isolamento espacial.

A análise do evento reprodutivo da população de *G. americana* mostrou que 81,6% das plântulas foram geradas por cruzamentos, sendo: 61,7% aleatórios, 19,9% entre aparentados e 18,4% por prováveis apomíticos. Levanta-se aqui a hipótese de apomixia, devido à espécie ser dióica, portanto, como foi dito anteriormente, é impossível ocorrer auto-fecundação. A presença de acasalamentos endo-gâmicos ou entre relativos confirma os níveis de endogamia sugeridos pelos índices de fixação de Wright e desvios do equilíbrio de endogamia de Wright (EEW) para as progênies. A endogamia originada de cruzamento entre aparentados, cria efeitos menos drásticos em uma geração de acasalamentos do que a autofecundação em uma planta monoica, porém, os mesmos efeitos em algumas gerações de cruzamentos entre aparentados (Allard, 1971). Segundo Crestana (1993), em meados do mês de novembro já existe uma pequena quantidade de flores estaminadas (masculinas) abertas, sendo que o pico da florada ocorre em meados de janeiro. Por sua vez, a antese das flores pistiladas (femininas) inicia-se em meados do mês de novembro, atingindo seu pico no início de dezembro. Como essas flores permanecem presas aos ramos, depois de abertas, evidencia-se um mês de sobreposição entre a florada masculina e a feminina. Contudo, possibilita acasalamentos preferenciais entre os poucos indivíduos masculinos floridos, no início e pico da florada feminina, dado que nem todos os indivíduos estão na mesma fase fenológica ou têm a possibilidade de ser visitados por polinizadores ao mesmo tempo. Quanto à hipótese de apomixia, em concordância, Crestana (1993) observou tal forma de reprodução na população. A autora também notou que todas as flores pistiladas formam frutos e que a proporção do número de flores femininas para o número de frutos é de 1:1. Esta alta proporção de frutos para flores, combinada com um certo assincronismo na florada masculina e feminina, insinua a possibilidade das flores não polinizadas gerarem se-

mentes apo-míticas. Porém, Sebbenn (1997) submeteu os dados aqui em estudo, a um teste específico, visando detectar tal forma de reprodução, contudo, os resultados rejeitaram a possibilidade de que os 18,4% da diferença entre a 1,0 sejam devido à apomixia e indicaram um excesso de homozigotos, o que por sua vez, indica a atuação de outros fatores não ligados ao sistema reprodutivo, como seleção. Este resultado também pode estar relacionado aos problemas de amostragem, como baixo número de locos polimórficos ou locos inadequados (baixo polimorfismo), utilizados para a estimativa da taxa de cruzamento.

Quanto à endogamia detectada na população, esta sugere a existência de estrutura familiar dentro da população. O'Malley et al. (1988), atribuíram à endogamia observada em progênies de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. a presença de estruturação genética espacial, devido à sua característica de ocorrer em reboleiras. *G. americana* é uma espécie que também ocorre agrupada, em forma de reboleiras (Sebbenn, 1997), permitindo a ocorrência de estruturação.

Estrutura Genética Espacial

A estruturação genética pode ter efeitos drásticos sobre a distribuição da variabilidade genética, visto que acasalamentos entre aparentados geram endogamia. Contudo, a análise de autocorrelação espacial rejeitou a pressuposição de estruturação espacial, mostrando que os genótipos estão aleatoriamente distribuídos na população de *G. americana*. É importante ressaltar que a inexistência de estruturação familiar não significa que não existam indivíduos aparentados na população; provavelmente esses até existam, porém, não se encontram agrupados. A não detecção de estruturação pode, contudo, estar ligada à amostragem deficiente dos indivíduos masculinos fornecedores de pólen que deram origem

às plântulas. Como a espécie é dióica, os acasalamentos só podem ocorrer entre indivíduos de sexos diferentes e a estruturação pode estar associada aos indivíduos masculinos localizados próximos às matrizes, que, porém, não foram avaliados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Finalmente, os altos valores de \hat{H}_e , a aderência das frequências genóticas ao EHW, para os adultos, e as evidências de seleção em favor de heterozigotos, mostram a população de *G. americana* como potencialmente apta à conservação *in situ*. Caso realmente exista apomixia na espécie, essa não será prejudicial à variabilidade genética, dado que a apomixia reproduz o genótipo materno, mantendo assim, os atuais níveis de heterozigosidade detectados, e aumentando a proporção de plantas femininas na população, hoje menor que a masculina (segundo Crestana (1993), existem nessa população 50 plantas femininas e 75 plantas masculinas), que por sua vez, ampliará a probabilidade de cruzamentos dentro da população.

O potencial evolutivo da população, mostrado pela heterozigosidade, possivelmente permitirá a adaptação dos genótipos às futuras mudanças ambientais, que porventura poderão advir, em circunstância do grande número de novas recombinações genóticas que poderão ser gerados.

Finalmente, considerando-se a grande dificuldade atual para a obtenção de sementes de espécies arbóreas tropicais com níveis adequados de variabilidade genética, para a recuperação de áreas degradadas, em especial das matas ciliares e, dado os resultados aqui observados, como alta heterozigosidade e reprodução por cruzamentos, é possível afirmar que esta população de *G. americana* pode ser utilizada como "área para a coleta de sementes". Para contornar os altos níveis de

endogamia detectados nas plântulas, recomenda-se que as sementes sejam colhidas do maior número possível de matrizes e em quantidades iguais por árvores, visando à maior representatividade genética da população e o controle gamético materno, práticas que levam a uma otimização do tamanho efetivo das sementes coletadas, para fins de reflorestamento.

CONCLUSÕES

O estudo genético de *G. americana*, a partir de dados de isoenzimas, possibilitou concluir que:

Os níveis de heterozigosidade esperados foram altos para a população de adultos se comparados à média de outras espécies arbóreas tropicais estudadas. A alta heterozigosidade é de valor relevante, visto que permite novas recombinações genóticas e, por tais razões, a plasticidade adaptativa da espécie às futuras mudanças ambientais e à colonização de novas áreas.

As plântulas mostraram baixa heterozigosidade, evidenciando a existência de acasalamentos endogâmicos refletidos pelos altos índices de fixação e pelas diferenças nas taxas de cruzamento multilocus e unilocus.

Os altos níveis de heterozigosidade nos adultos, combinado com a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, gerando plântulas fora do equilíbrio e com altos níveis de endogamia, sugerem a existência de seleção em favor dos heterozigotos da fase de plântula para a fase adulta.

O estudo do sistema reprodutivo revela a espécie como de acasalamento misto, gerando descendentes através de cruzamentos alogâmicos e endogâmicos.

A análise da distribuição espacial dos genótipos não revelou estruturação genética, dando a entender que os indivíduos se encontram distribuídos aleatoriamente na população.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

ALEXANDRE MAGNO SEBBENN é doutorando no Curso de Pós Graduação em Genética na ESALQ/USP.

PAULO YOSHIO KAGEYAMA é Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. Av. Pádua Dias, 11 - 13418-900 - Piracicaba, SP

ROLAND VENCOVSKY é Professor Aposentado do Departamento de Genética da ESALQ/

USP. Av. Pádua Dias, 11 - 13418-900 - Piracicaba, SP

Os autores agradecem à Dra. Cybele de Souza Machado Crestana, Dra. Ana Cristina Machado Siqueira, MSc. Marco Antonio de Oliveira Garrido, aos Técnicos em Agropecuária Gelson Dias Fernandes e José Amarildo da Fonseca, pessoas que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho e à CAPES, pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, S.A.; PETERS, I.P.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. *Eletroforese de proteínas e fungos em essências florestais*. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- ALLARD, R.W. *Princípios do melhoramento genético das plantas*. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.
- BAWA, K.S. "Breeding systems of tree species For a lowland tropical community". *Evolution*, v. 28, p. 85-92, 1974.
- BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. "Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees: 1- sexual systems and incompatibility mechanisms". *American journal of botany*, v. 72, n. 3, p. 331-345, 1985.
- BROWN, A.H.D. "Enzyme polymorphism in plant populations". *Theoretical population biology*, v. 15, p. 1-42, 1979.
- CARVALHO, P.E.R. *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640p.
- CHELIAK, W.M.; PITEL, J.A. "Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species". *Information report PI-X*, n. 42, p. 1-49, 1984.
- CLEGG, M.T. "Measuring plant mating systems". *Bioscience*, v. 30, n. 12, p. 814-818, 1980.
- CRESTANA, C.S.M. *Biologia da reprodução de Genipa americana L. (Rubiaceae) na Estação Ecológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo*. Rio Claro, 1993. 222p. Tese (Doutorado) - UNESP - Universidade Estadual Paulista.
- DEWEY, S.E.; HEYWOOD, J.S. "Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*: 1- distribution of genotypes". *Evolution*, v. 42, p. 834-838, 1988.
- DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J.C.B. "Recomposição de matas ciliares". *Série Registros IF*, v. 4, p. 1-14, 1990.
- EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland: Sinauer, 1990. p. 229-253.
- FUTUYMA, D.J. *Biologia evolutiva*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- HAMRICK, J.L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P., ed. *Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations*. London: Chapman and Hall, 1989. p. 87-105.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland: Sinauer, 1990. p. 43-63.
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: association with reproductive biology. In: BOCK, J.H.; LINHART, Y.B., ed. *The evolutionary ecology of plants*. Boulder: Westview Press, 1989. p. 129-146.
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. "Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results". *Biotropica*, v. 18, p. 201-207, 1986.

- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. "Relationships between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants". *Annual review of ecology and systematics*, n. 10, p. 173-200, 1979.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam: North-Holland, 1976. 17 p.
- KIRKPATRICK, R.E.B.; SOLTIS, P.; SOLTIS, D.E. "Mating system and distribution of genetic variation in *Gymnocarpium dryopteris* ssp. *disjunctum*". *American journal of botany*, v. 77, n. 8, p. 1101-1110, 1990.
- KÖPPEN, W. *Climatologia*. México: Fundo de Cultura Económica, 1948. 207p.
- LEPSCH-CUNHA, N. *Estrutura genética e fenologia de espécies raras de Couratari (Lecythidaceae) na Amazonia Central*. Piracicaba: 1996. 164p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.
- LI, C.C.; HORVITZ, D.G. "Some methods of estimating the inbreeding coefficient". *American journal of human genetics*, v. 5, p. 107-117, 1953.
- LIENGSI, C.; YET, F.C.; BOYLE, T.J.B. "Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Pterocarpus macrocarpus* Kurz in Thailand". *Forest ecology and management*, v. 74, p. 13-22, 1995.
- LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. "Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae)". *American journal of botany*, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, 1995.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 1, p. 302.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. "Ecological determinants of genetic structure in plant populations". *Annual review of ecology and systematics*, v. 15, p. 65-95, 1984.
- MANTOVANI, W.; ROSSI, L.; NETO, S.R.; ASSAD-LUDEWIGS, I.Y.; WANDERLEY, M.G.L.; MELO, M.M.R.F.; TOLEDO, C.B. Estudo fitossociológico de áreas de mata ciliar em Moji Guaçu, SP, Brasil. In: BARBOSA, L.M., ed. *Anais do Simpósio sobre mata ciliar*. Campinas: Fundação Cargill, 1989. p. 235-267.
- MORAES, M.L.T. *Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira Myracrodruon urundeuva F.F. e M.F. Allemão Anacardiaceae (Syn: Astronium urundeuva (Fr. Allemão) Engler*. Piracicaba, 1993. 139p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- MURAWSKI, D.A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from a canopy perspective. In: LOWMAN, M.D.; NADKARMI, N.M. *Forest canopies*. New York: Academic Press, 1995. p. 457-493.
- MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S. "Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forest". *Biotropica*, v. 26, n. 1, p. 23-29, 1994.
- NEI, M. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.
- NILSSON, T.T. Levantamento do potencial econômico da mata ciliar e sugestões quanto ao seu aproveitamento racional. In: BARBOSA, L.M., ed. *Anais do Simpósio sobre mata ciliar*. Campinas: Fundação Cargill, 1989. p. 144-155.
- NOGUEIRA, J.C.B. Recomposição da mata ciliar da Usina Ester em Cosmópolis, Reserva Florestal de Bauru (Instituto Florestal) e Oeste do Estado de São Paulo. In: BARBOSA, L.M., ed. *Anais do Simpósio sobre mata ciliar*. Campinas: Fundação Cargill, 1989. p. 156-159.
- O'MALLEY, D.M.; BAWA, K.S. "Mating system of a tropical rain forest tree species". *American journal of botany*, v. 74, n. 8, p. 1143-1149, 1987.
- O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. "Genetic of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae)". *Theoretical application genetic*, v. 76, p. 929-932, 1988.
- REIS, M.S. *Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (Euterpe edulis Mart)*. Piracicaba, 1996. 210p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- RITLAND, K. "A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems". *Journal of heredity*, v. 81, p. 235-237, 1990.
- RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y.A. "The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-Fir as shown by efficient multilocus model". *Theoretical application genetic*, v. 71, p. 375-384, 1985.
- RITLAND, K.; JAIN, S. "A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequency using independent loci". *Heredity*, v. 47, p. 35-52, 1981.
- SEBBENN, A.M. *Estrutura genética de subpopulações de Genipa americana L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas*. Piracicaba, 1997. 107p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- SHAW, D.V.; ALLARD, R.W. "Estimation of outcrossing rates in Douglas-Fir using isozyme markers". *Theoretical application genetic*, v. 62, p. 113-120, 1982.

- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. "Spatial autocorrelation in biology: 1- methodology". *Biological journal of the Linn. Society*, v. 10, p. 199-228, 1978.
- SOKAL, R.R.; ODEN, N.L. "Spatial autocorrelation in biology: 2- some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest". *Biological journal of the Linn. Society*, v. 10, p. 229-249, 1978.
- STEBBINS, G.L. Introduction. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S., ed. *Isozymes in plant biology*. Portland: Dioscorides Press, 1989. p. 73-86.
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER. *Byosys-1: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1,7*. Chicago: Illinois Natural History Survey, 1989. 43p.
- VENCOVSKY, R. "Variance of an estimate of outcrossing rate". *Revista brasileira de genética*, v. 17, n. 3, p. 349-351, 1994.
- WORKMAN, P.; NISWANDER, J.L. "Population studies on Southwestern Indian tribes: 2- local genetic differentiation in the Papago". *American journal human genetic*, v. 22, p. 24-49, 1970.
- WRIGHT, S. "The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating". *Evolution*, v. 19, p. 395-420, 1965.

Scientia Forestalis (ISSN 1413-9324) é publicada semestralmente pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) em convênio com o Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. *Scientia Forestalis* publica trabalhos científicos inéditos relacionados com as diversas áreas das Ciências Florestais. Pesquisadores atuando em silvicultura, manejo florestal, conservação da natureza, impactos ambientais em florestas, tecnologia de madeiras, produtos florestais e áreas correlatas, são encorajados a submeterem seus trabalhos à Comissão Editorial.

Os assuntos tratados devem ser diretamente ligados às Ciências Florestais ou devem possuir clara implicação sobre o desenvolvimento científico e tecnológico no contexto florestal. Diversos tipos de trabalhos científicos são publicados. Trabalhos de pesquisa: comunicação de pesquisa original. Trabalho de revisão: revisão “estado-da-arte” numa área científica particular. Comunicações: comunicações breves a respeito de metodologias ou resultados preliminares. Carta ao editor: comentários sobre trabalhos já publicados na *Scientia Forestalis*. Resenha de livro: análise de livro publicado recentemente.

Os manuscritos devem ser submetidos à Comissão Editorial em três cópias. Inicialmente, somente manuscritos impressos são necessários. Após a aceitação do trabalho, será solicitado o manuscrito em formato digital. Para maiores informações contate:

Scientia Forestalis
IPEF - ESALQ/USP
Av. Pádua Dias, 11 - Caixa Postal 530
13400-970, Piracicaba, SP - BRASIL
fone: 55-019-430-8618; 430-8641
fax: 55-019-430-8666
E-mail: mmpoggia@carpa.ciagri.usp.br

O conteúdo e as opiniões apresentadas nos trabalhos publicados não são de responsabilidade de *Scientia Forestalis* e não representam necessariamente as opiniões do IPEF ou do Departamento de Ciências Florestais, ESALQ, USP.

Scientia forestalis (ISSN 1413-9324; primeiro número 50) dá continuidade à revista “IPEF” (ISSN 0100-4557; último número 48/49).

Revista indexada pela CAB INTERNATIONAL

Comissão Editorial/*Editorial Board*

João Luiz Ferreira Batista
Editor Chefe/*Editor-in-Chief*
Marialice Metzker Poggiani
Editor Assistente/*Assistant Editor*
Antonio Natal Gonçalves
Editor de Biotecnologia e Melhoramento / *Biotechnology and Tree Improvement*
Fábio Poggiani
Editor de Ecologia e Gerenciamento Ambiental / *Ecology and Environment Management*
Fernando Seixas
Editor de Silvicultura e Manejo Florestal / *Silviculture and Forest Management*
Ivaldo Pontes Jankowsky
Editor de Tecnologia de Produtos Florestais / *Forest Products Technology*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)
UNIVERSITY OF SÃO PAULO

Jacques Marcovitch
Reitor/*President*

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ)
“Luiz de Queiroz” College of Agriculture

Júlio Marcos Filho
Diretor/*Dean*

Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF)
Institute for Forest Research and Studies

Manoel de Freitas (Champion Papel e Celulose Ltda.)
Presidente/*President*

José Otávio Brito(ESALQ-USP)
Diretor Científico/*Scientific Director*

Scientia Forestalis (ISSN 1413-9324) publishes original scientific papers related to the several fields of Forest Sciences. It is published biannually by the Institute for Forest Research and Studies (IPEF) and the Department of Forest Sciences, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture (ESALQ), University of São Paulo (USP). Researchers from national or international institutions, working on forestry, forest conservation, impacts on forest environment, wood technology, forest products and related areas, are welcome to submit their papers to the Editorial Board.

Paper subject should be directly related to Forest Sciences or should have a clear implication on scientific and technological development of forest or forestry activities. Several paper formats are accepted. Research paper: original research communication. Review paper: review of the “state-of-the-art” in a particular scientific area. Technical note: short communications on methodology or preliminary results.

Letter to the editor: comments on papers published in *Scientia Forestalis*. Book review: comments on a recently published book.

Manuscripts should be submitted in three copies to the Editorial Board. For initial submission, only printed manuscripts are necessary. After paper acceptance, digital format manuscripts will be requested. For detailed information on manuscript format contact:

Scientia Forestalis
IPEF - ESALQ/USP
Av. Pádua Dias, 11 - Caixa Postal 530
13400-970, Piracicaba, SP - BRAZIL
phone: 55-019-430-8618; 430-8641
fax: 55-019-430-8666
E-mail: mmpoggia@carpa.ciagri.usp.br

Contents and opinions presented on published papers are not responsibility of *Scientia Forestalis* and do not necessarily represent the opinion of IPEF nor of Department of Forest Sciences, ESALQ, University of São Paulo.

Scientia forestalis (ISSN 1413-9324; first number 50) continues “IPEF” journal (ISSN 0100-4557; last number 48/49).

Empresas Associadas ao IPEF/Members of IPEF

ARACRUZ CELULOSE S/A - Espírito Santo
BAHIA SUL CELULOSE S/A - Bahia
CAF SANTA BÁRBARA LTDA. - Minas Gerais
CENIBRA FLORESTAL S/A - Minas Gerais
CHAMPION PAPEL E CELULOSE LTDA. - São Paulo
CIA. SUZANO DE PAPEL E CELULOSE S/A - São Paulo
DURAFLORA S/A - São Paulo
EUCATEX FLORESTAL LTDA. - São Paulo
INPACEL - INDÚSTRIAS DE PAPEL ARAPOTI S/A - Paraná
KLABIN - FABRICADORA DE PAPEL E CELULOSE S/A - Paraná
LWARCEL CELULOSE E PAPEL LTDA.- São Paulo
PISA FLORESTAL S/A - Paraná
RIPASA S/A CELULOSE E PAPEL - São Paulo
RIOCELL S/A - Rio Grande do Sul
VOTORANTIM CELULOSE E PAPEL S/A - São Paulo

Projeto Gráfico: Adriana Garcia e Maria Cristina Bugan
Editoração: Studium Generale