

ESTRUTURA GENÉTICA DE SUBPOPULAÇÕES DE *Genipa americana* L. (RUBIACEAE) EM MATA CILIAR A PARTIR DE ISOENZIMAS¹

Alexandre Magno SEBBENN²

Paulo Yoshio KAGEYAMA³

Roland VENCOVSKY⁴

RESUMO

Estudou-se a estrutura genética de duas subpopulações naturais de *Genipa americana* L., situadas na mata ciliar do Rio Moji-Guaçu, SP, denominada "Mata da Figueira", de propriedade do Instituto Florestal do Estado de São Paulo, a partir da eletroforese de isoenzimas, discorrendo-se sobre as possíveis estratégias de conservação genética *in situ*. A partir da análise de isoenzimas, obtiveram-se 13 alelos distribuídos entre 8 locos, sendo 4 monomórficos e 4 polimórficos. O coeficiente de coancestralidade de Cockerham ($\hat{\theta}_p$) revelou que 99,4% da variabilidade genética dos indivíduos adultos encontra-se dentro das subpopulações e 100% nas plântulas. Os índices de fixação de Wright foram, em média, negativos para os adultos ($\hat{f} = -0,064$; $\hat{F} = -0,058$) e positivos para as plântulas ($\hat{f} = 0,300$; $\hat{F} = 0,283$), mostrando ausência de endogamia nos adultos e acentuada endogamia nas plântulas. Dada a proximidade na magnitude das estimativas médias de \hat{f} e \hat{F} , para ambos os adultos e plântulas, conclui-se que a endogamia total da população é explicada pelos níveis de endogamia contida dentro das subpopulações. Verifica-se através dos resultados que as subpopulações constituem uma única população, tendo propriedades genéticas comuns, compartilhando o mesmo conjunto gênico. Os índices de diversidade estimados para a população revelaram um baixo número de alelos por locos ($A = 1,63$) e uma média percentagem de locos polimórficos ($P = 50\%$), para adultos e plântulas. A heterozigosidade média esperada foi alta para adultos e plântulas ($H_e = 0,182$; $H_e = 0,149$, respectivamente), revelando a população como potencial para a conservação *in situ*. O índice de fixação para a população foi negativo para os adultos ($\hat{f} = -0,071$) e positivo para as plântulas ($\hat{f} = 0,302$), 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. Índices de cruzamentos endogâmicos foram detectados pelos índices de fixação de Wright e coeficientes de coancestralidade entre plantas, dentro de famílias $\hat{\theta}_F$, sugerindo estruturação espacial na população.

Palavras-chave: estrutura genética; *Genipa americana*; coeficiente de coancestralidade de Cockerham; índices de diversidade.

ABSTRACT

The genetic structure of two natural subpopulations of the tropical forest tree *Genipa americana* L. was studied using isoenzymes electrophoretic techniques. The study site was located at a Moji-Guaçu river riparian forest, São Paulo State, Brazil, owned by the São Paulo Forestry Institute. The objectives of the research were to suggest possible strategies for *in situ* genetic conservation. Thirteen alleles distributed in eight loci were obtained on the research. Four of these loci were monomorphic and four were polymorphic. The genetic structure analysed Cockerham coancestry coefficient ($\hat{\theta}_p$) revealed that 99.4% of the variability is distributed within the subpopulations. The Weir F's, for the adult plants, revealed negative values for the average allele fixation within subpopulations ($\hat{f} = -0.064$) and for the population as a whole ($\hat{F} = -0.058$). In the progenies analyses, the values were positive ($\hat{f} = 0.300$; $\hat{F} = 0.283$). The $\hat{\theta}_F$ estimate was 0.190, indicating the existence of endogamic mating. The results revealed that both subpopulations constitute a single population. The average allele number per locus was 1.63 and the polymorphic locus percentage was 50% (99% probability) for both adults and progenies. The average estimated heterozygosity (H_e) was high for adults (0.182) and for progenies (0.149). The Wright allelic fixation index (\hat{f}) was negative for adults (-0.071) and positive for the progenies (0.302), suggesting deviation of heterozygote proportions from Hardy-Weinberg expectation for the progenies, with probable endogamic mating and selection favoring the heterozygotes between the plantule and adult phase. The existence of endogamic mating is coherent with the Wright \hat{f} , suggesting genetic structuration within the subpopulations.

Key words: genetic structure; *Genipa americana*; Cockerham coancestry coefficient; diversity index.

(1) Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada em 03/03/97 à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, Piracicaba e aceito para publicação em junho de 1998.

(2) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 0159-970, São Paulo, SP, Brasil.

(3) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

(4) ESALQ/USP, Departamento de Genética, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

A eficiência de qualquer programa de conservação e melhoramento genético depende diretamente dos níveis de variabilidade genética das espécies. Para a implantação desses programas é fundamental conhecer a estrutura genética das populações da espécie de interesse, ou seja, como a variabilidade genética se distribui entre e dentro das populações. O conhecimento dessas informações permitirá o delineamento correto das estratégias de conservação da espécie ou até mesmo de um ecossistema.

As florestas ciliares ou de galeria são ecossistemas estratégicos para a conservação da biodiversidade, preservação da qualidade da água e formação de corredores genéticos entre as florestas primárias existentes nas margens dos rios. Entretanto, devido ao estado degradado das florestas naturais no Estado de São Paulo e conseqüentemente das florestas ciliares, há necessidade imediata de estudos genéticos populacionais das espécies que compõem tais ecossistemas para fins de conservação *in situ*, antes que sejam extintas. As populações das espécies que estiverem aptas e conservadas poderão, no futuro, ser utilizadas como "áreas para coletas de sementes" para fins de recuperação de áreas degradadas. Todavia, em face da impossibilidade prática e econômica da avaliação genética de todas as espécies arbóreas que compõem um determinado ecossistema, devem ser priorizadas as pesquisas nas espécies que os representam, ou em outras palavras, que sirvam de modelo para essas comunidades.

Entre as espécies arbóreas tropicais adaptadas às matas ciliares, tem-se *Genipa americana* L., cuja estrutura genética pode, possivelmente, ser adequada para representar espécies de dispersão hidrocórica e polinização entomofílica. Assim, estudou-se a estrutura genética intrapopulacional de uma população natural de *G. americana*, dividida em duas subpopulações, a partir da eletroforese de isoenzimas. Este estudo procurou testar as seguintes hipóteses: i) que as subpopulações de *G. americana* foram formadas a partir de poucos migrantes, vindos de populações à montante do rio através da hidrocória e que, após se estabelecerem, se expandiram com indivíduos altamente aparentados; ii) que, devido à pequena distância entre as subpopulações, ao efeito fundador e à localização

dentro de um mesmo fragmento de mata ciliar, ambas caracterizam subunidades de uma mesma população.

Considerando-se estas hipóteses, objetivou-se mais especificamente: a) caracterizar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das subpopulações; b) quantificar a variabilidade genética na população, e c) estimar os níveis de endogamia nas subpopulações e na população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Espécie *Genipa americana* L.

G. americana é uma espécie arbórea tropical que se distribui naturalmente entre as latitudes 20°N (México) a 20°S (Brasil em São Paulo). No estágio sucessional a espécie é classificada como secundária tardia, o sistema reprodutivo é dióico, a polinização é entomofílica, efetivada principalmente por mamangavas *Bombus morio* e *Epicharis rustica flava* e a dispersão é zoocórica e hidrocórica. A árvore apresenta uma altura média de 8 a 14 metros, DAP de 49 a 60 centímetros, podendo atingir até 25 metros de altura e 90 centímetros de DAP. O tronco é reto e cilíndrico, normalmente com fuste curto. A planta é heliófita, seletiva, higrófila, característica de florestas pluviais e semidecíduas situadas em várzeas úmidas e brejosas. A espécie pode ocorrer em outras formações florestais, todavia, sempre em terrenos muito úmidos. É encontrada tanto no interior da mata primária como nas formações secundárias e produz, anualmente, grande quantidade de sementes viáveis (CRESTANA, 1993; CARVALHO, 1994).

G. americana está classificada na Colômbia como espécie em perigo de extinção. A Smurfit Carton del Colombia vem conservando a espécie na forma *ex situ* (WRIGHT, 1993). O Instituto Florestal de São Paulo, igualmente, está conservando *G. americana* em forma de teste de progênies com 20 famílias, na Estação Experimental de Jaú, SP. Entretanto, ainda não existem resultados genéticos desse ensaio.

2.2 Eletroforese de Isoenzimas

O desenvolvimento da técnica de eletroforese de isoenzimas, através da detecção de diferentes cargas, na variação entre proteínas solúveis, causou um grande impacto no estudos de genética de populações (WEIR, 1990). Nas duas últimas décadas, esta ferramenta tem sido a mais utilizada para a análise da estrutura genética de populações. Até o final da década de 80 mais de 700 espécies de plantas foram estudadas do ponto de vista populacional, através da eletroforese (HAMRICK & GODT, 1990). A habilidade para observar variação em locos isoenzimáticos tem também revolucionado as pesquisas no campo da genética bioquímica e evolutiva (HAMRICK, 1989; WEEDEN & WENDEL, 1990; KEPHART, 1990). Além da estrutura genética das populações, tanto o sistema de acasalamento, quanto o fluxo gênico e os efeitos da seleção também foram extensivamente investigados em populações naturais de espécies arbóreas, usando-se métodos bioquímicos (ROBERDS & BROTSCHOL, 1985; HAMRICK, 1989).

Seu grande potencial, para estudos de genética de populações, advém da necessidade de apenas uma pequena amostra de material de cada indivíduo e da possibilidade de analisar-se um grande número de indivíduos de cada população, com uma técnica relativamente simples, contudo precisa (HARRIS & HOPKINSON, 1976).

A eletroforese de isoenzimas consiste no movimento de enzimas em um gel submetido à influência de uma corrente elétrica. A taxa de migração é determinada pelo tamanho, forma e carga elétrica da proteína (HARRIS & HOPKINSON, 1976; CONKLE *et al.*, 1982; ALFENAS *et al.* 1991; WEIR, 1990).

HAMRICK *et al.* (1979) e HAMRICK (1989) descreveram as vantagens da técnica sobre os métodos clássicos quantitativos, na análise da estrutura genética de populações. CHELIAK & PITEL (1984) acrescentaram outras vantagens da técnica nesses estudos, ressaltando, principalmente, o caráter neutro desses marcadores, portanto, teoricamente não sofrem seleção. Por sua vez, BROWN *et al.* (1989) apresentaram as vantagens dos estudos dos sistemas de reprodução em plantas, a partir da eletroforese, comparativamente aos marcadores morfológicos.

Vários são os artigos que descrevem detalhadamente a técnica de eletroforese de isoenzimas, destacando-se os trabalhos de HARRIS & HOPKINSON (1976), CONKLE *et al.* (1982), YAMADA & GURIES (1989) e ALFENAS *et al.* (1991).

2.3 Estrutura e Variabilidade Genética

É comum acordo, entre geneticistas, que 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 (BAWA & O'MALLEY, 1987). Esta variabilidade manifesta-se ao nível molecular de indivíduos dentro de população, de população dentro de espécie, ao nível de espécie e ao nível de ecossistema. O conhecimento dos níveis de variabilidade genética e de sua distribuição entre e dentro de populações (estrutura genética), assume importância porque indica os caminhos a serem adotados, para o sucesso nas estratégias de manejo e conservação genética (KAGEYAMA, 1987).

O estudo da variabilidade genética em populações naturais envolve duas questões básicas: a primeira, é descrever os níveis de variação genética mantida dentro das populações de espécies; a segunda, é de particular importância para a conservação genética, visto ser conhecida como o caminho pelo qual a variação genética é distribuída entre e dentro de populações (HAMRICK, 1983; LOVELESS & HAMRICK, 1987; KAGEYAMA, 1987). Esta estrutura genética resulta da ação combinada de mutação, migração, seleção e deriva genética, que em muitos termos, operam dentro de um contexto histórico e ecológico em cada espécie de planta (LOVELESS & HAMRICK, 1984; ALVAREZ-BUYLLA & GARAY, 1994). A distribuição dessa variabilidade em populações naturais é influenciada, principalmente, pelo sistema reprodutivo, modo de reprodução, tamanho efetivo da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (HAMRICK, 1983).

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 progênicas; dispersão das progênicas; eventos casuais, e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem às populações futuras (CLEGG *et al.*, 1978).

A estrutura genética de populações, a partir de isoenzimas, pode ser caracterizada através de três metodologias estatísticas distintas: análise de variância de frequências alélicas (COCKERHAM, 1969; WEIR, 1990; VENCOVSKY, 1992), estimativas da diversidade genética de NEI (NEI, 1973) e estatística F de Wright (WRIGHT, 1965). Ressalta-se que melhores estimativas da estrutura populacional são obtidas pela análise de variância, dado que seu modelo considera o processo amostral (níveis hierárquicos) nos cálculos. Contudo, este método tem sido pouco usado, devido à complexidade de suas estimativas.

Finalmente, a conservação genética de populações de plantas que apresentem pouco interesse na atualidade e cuja estrutura genética é conhecida, deve pautar-se por um procedimento amostral tão amplo quanto possível (DIAS & KAGEYAMA, 1991). 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 (LIENGSIRO *et al.*, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Estudo

O trabalho foi realizado em floresta mesófila semidecídua de planalto, em duas subpopulações (SPop's) naturais de *G. americana*,

localizadas na mata ciliar do Rio Moji-Guaçu, pertencente à Estação Ecológica de Moji-Guaçu, Fazenda "Campininha", da Estação Experimental de Moji-Guaçu, do Instituto Florestal de São Paulo. A mata situa-se nas coordenadas 22° 16' S. e 47° 11' W., em altitude média de 600 m. Os solos estão classificados nos tipos LVa e LE. Esses solos de planície de inundações (hidromórficos) estão sujeitos a alagamentos periódicos nas épocas de cheias do rio (MANTOVANI *et al.*, 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 de KÖPPEN (1948). A estação seca prolonga-se de maio a agosto, com 86,18% da precipitação (1314 mm anuais) concentrados nos meses chuvosos (setembro a abril) (CRESTANA, 1993).

A floresta ocupa cerca de 7,2 ha da Estação Ecológica, sendo mata ciliar remanescente da Bacia Hidrográfica Mojiana, na qual o rio de mesmo nome percorre aproximadamente 660 metros (CRESTANA, 1993). GIBBS & LEITÃO FILHO (1978), GIBBS *et al.* (1980) e MANTOVANI *et al.* (1989) dão informações sobre a composição florística e fitossociológica da mata ciliar em questão e CRESTANA (1993) define a área como de ocorrência natural de *G. americana*.

3.2 Amostragem

A intensidade amostral encontra-se na TABELA 1. Uma vez que um dos objetivos deste estudo foi a caracterização da estrutura genética das SPop's, a amostragem dos indivíduos adultos foi totalmente aleatória, procurando-se apenas abranger toda a área de ocorrência natural da espécie na mata, dentro das SPop's. A distância entre as subpopulações era de aproximadamente 130 metros.

TABELA 1 - Área aproximada das SPop's, densidade de amostragem dos indivíduos adultos, número de famílias e tamanho da prole em SPop's e população (Pop) de *G. americana*.

Unidade	Área (ha)	Adultos			Famílias	Tamanho da prole por família
		Masculinas (M)	Femininas (F)	M + F		
SPop1	2,7	8	7	15	5	30
SPop2	4,5	7	20	27	10	30
Pop	7,2	15	27	42	15	30

SEBBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. & VENCOVSKY, R. Estrutura genética de supopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em mata ciliar a partir de isoenzimas.

A eletroforese de isoenzimas foi realizada no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, segundo a metodologia proposta por KEPHART (1990) e ALFENAS *et al.* (1991). Para essa caracterização utilizaram-se tecidos foliares de plântulas com 8 a 10 meses de idade e de indivíduos adultos. A eletroforese foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%. A extração das enzimas empregava aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, macerado com adição de aproximadamente 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polyvinyl Pirrolidone (PVP 40), 7 mg de Polyvinyl Pirrolidone (PVP-360) e 200 microlitros de solução de extração número 1 de ALFENAS *et al.* (1991), modificada pela ausência de 2-Mercaptoetanol. O tampão de cuba e gel foi o Tris-Citrato pH 7.5 (ALFENAS *et al.*, 1991). As enzimas usadas são descritas em SEBBEN (1997). Os cinco sistemas enzimáticos foram: Fosfoglucomutase (PGM - E.C. 2.7.5.1.), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH - E.C. 1.1.1.29), Fosfogluose Isomerase (PGI - E.C. 5.3.1.9), Malato Desidrogenase (MDH - E.C. 1.1.1.37) e Peroxidase (PRX - E.C. 1.1.1.17). Cada gel acondicionava amostras de 20 indivíduos, sendo, nas duas extremidades, adicionados papéis de filtro (dimensões de 1 x 5 mm) embebidos em solução de azul de bromofenol a 0,1%, objetivando marcar a distância máxima possível de migração das isoenzimas durante a "corrida". A distinção dos locos aparentes foi a mesma definida por REIS (1996): cada região do zimograma que apresentasse um comportamento aparentemente independente dos demais e que pudesse ser interpretado geneticamente ou que ostentasse uma segregação mendeliana aparente, definiu-se como loco. Afirma o autor que a coerência entre genitor feminino (receptor de pólen) e progênie proporciona a devida consistência a essa forma de interpretação.

3.3 Análise dos Dados

A estrutura genética das subpopulações foi caracterizada a partir do coeficiente de coancestralidade de Cockerham (θ_p) obtido da análise de variância de frequências alélicas (COCKERHAN, 1969;

WEIR, 1990; VENCOVSKY, 1992). Essas análises foram obtidas através do procedimento VARCOMP, do programa estatístico SAS (S.A.S. INSTITUTE, 1985).

A variabilidade genética da população (conjunto de subpopulações) foi caracterizada pelos índices de diversidade 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) ao nível de 99% de probabilidade e índices de fixação de Wright (\hat{f}). Estas estimativas foram obtidas a partir do programa BIOSYS-1 (SWOFFORD & SELANDER, 1989).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistemas Isoenzimáticos

Testaram-se 23 sistemas de coloração *in vitro* em três sistemas de tampão eletrodo/gel, porém, visando agilizar e otimizar as rotinas de laboratório, escolheram-se aleatoriamente oito sistemas de coloração, no sistema tampão eletrodo/gel Tris Citrato, que revelou o maior número de sistemas isoenzimáticos. Os sistemas de coloração escolhidos foram SKDH, ACP, β -EST, 6PGDH, PGI, PGM, MDH e PRX, contudo, dos oito sistemas utilizados, só os cinco últimos foram passíveis de interpretação. A interpretação dos zimogramas é coerente com os padrões encontrados em trabalhos similares, sendo que as cinco enzimas interpretadas apresentaram os seguintes padrões: 1. Fosfoglucomutase (PGM): revelou apenas 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. Fosfogluose Isomerase (PGI): esta enzima também 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): o sistema revelou três zonas de atividades, sendo a mais catódica e a intermediária interpretadas como dois locos polimórficos formados por enzimas monômeras; contendo 2 alelos, e a mais anódica interpretada como um loco monomórfico, apresentando apenas um alelo, fixado; 5. Peroxidase (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.

4.2 Estrutura Genética

A hipótese de que ambas as subpopulações (SPop's) constituem uma única população, foi testada através da análise das frequências alélicas e da distribuição da variabilidade genética entre e dentro das SPop's. As estimativas dos índices de diversidade genética, bem como dos parâmetros quantificadores da estrutura genética das SPop's de *G. americana*, foram obtidas a partir das frequências alélicas de 13 alelos distribuídos em 8 locos isoenzimáticos (TABELA 2). As frequências alélicas foram obtidas para SPop's e para a população de adultos e plântulas, procurando-se facilitar algumas comparações e interpretações genéticas.

TABELA 2 - Frequências alélicas, tamanho da amostra (n) e número total de alelos (TA), em duas SPop's e na população (Pop) de adultos e plântulas de *G. americana*, para 8 locos isoenzimáticos.

Loco	Alelo	Adultos			Plântulas		
		SPop1	SPop2	Pop	SPop1	SPop2	Pop
Pgm-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	n	15	27	42	99	195	294
6Pgdh-1	1	0,233	0,385	0,329	0,473	0,423	0,441
	2	0,567	0,500	0,524	0,505	0,494	0,489
	3	0,200	0,115	0,146	0,022	0,083	0,061
	n	15	26	41	92	163	255
Pgi-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	n	15	27	42	100	180	280
Pgi-2	1	0,533	0,426	0,464	0,490	0,515	0,507
	2	0,467	0,574	0,536	0,510	0,485	0,493
	n	15	27	42	99	199	298
Mdh-1	1	0,833	0,944	0,905	0,955	0,983	0,973
	2	0,167	0,056	0,095	0,045	0,017	0,023
	n	15	27	42	99	176	275
Mdh-2	1	0,933	0,870	0,893	0,955	0,961	0,958
	2	0,067	0,130	0,107	0,045	0,039	0,042
	n	15	27	42	99	190	289
Mdh-3	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	n	15	26	41	97	159	256
Prx-2	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	n	15	27	42	80	193	273
TA		13	13	13	13	13	13

SEBBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. & VENCovsky, R. Estrutura genética de supopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em mata ciliar a partir de isoenzimas.

As frequências alélicas variaram nas SPop's 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, na SPop1 das plântulas (0,022), e alelo 2 nos locos Mdh-1 e Mdh-2 nas SPop's e população das plântulas (0,045, 0,017, 0,023, 0,045, 0,039 e 0,042, respectivamente). As diferenças nas frequências alélicas, entre adultos e plântulas, ocorreram, em parte, devido aos indivíduos adultos não estarem diretamente relacionadas às plântulas, visto que na amostragem dos adultos foram incluídos 27 indivíduos a mais do que as 15 matrizes que deram origem às plântulas. Por outro lado, estas diferenças podem ser devido a outros fatores como seleção entre a fase de plântula e a fase adulta, e/ou deriva, advinda da amostragem não representativa do evento reprodutivo que deu origem as plântulas nas SPop's. Apesar dessa variação, não se detectou a ausência de nenhum alelo nas SPop's de adultos e plântulas, mostrando que ambas compartilham o mesmo conjunto gênico, ou seja, contêm os mesmos alelos. Obtiveram-se, assim, quatro locos monomórficos (Pgm-1, Pgi-1, Mdh-3 e Prx-2) e quatro locos polimórficos

(6Pgdh-1, Pgi-2, Mdh-1 e Mdh-2), para as estimativas dos parâmetros genéticos quantificadores da estrutura das subpopulações e variabilidade intrapopulacional.

As estimativas dos coeficientes de coancestralidade (TABELA 3) permitem obter a distribuição da variabilidade genética nos vários níveis hierárquicos da análise de variância para os adultos e plântulas. O coeficiente de coancestralidade $\hat{\theta}_p$ corresponde à estimativa \hat{G}_{ST} de NEI (1973) e \hat{F}_{ST} de WRIGHT (1965); \hat{F} corresponde à \hat{F}_{IT} , enquanto \hat{f} corresponde a \hat{F}_{IS} . O $\hat{\theta}_p$ é uma medida de divergência genética entre frequências alélicas de diferentes SPop's, $\hat{\theta}_F$ corresponde ao coeficiente de coancestralidade entre plantas, dentro de famílias, dentro de SPop's, $\hat{\theta}_F'$ tem a mesma definição do parâmetro anteriormente definido, porém, é um método que não considera o nível SPop's na sua estimativa, sendo assim, mais precisa para a definição deste parâmetro, \hat{f} fornecem os níveis de fixação alélica para a média das SPop's e \hat{F} para o total das SPop's, portanto, corresponde ao índice de fixação estimado para a população.

TABELA 3 - Coeficientes de coancestralidade entre duas SPop's de adultos e plântulas de *G. americana*.

	Loco	$\hat{\theta}_p$	$\hat{\theta}_F$	$\hat{\theta}_F'$	\hat{F}	\hat{f}
Adultos	6Pgdh-1	0,000	-----	-----	0,079	0,079
	Pgi-2	0,004	-----	-----	-0,278	-0,284
	Mdh-1	0,047	-----	-----	-0,066	-0,119
	Mdh-2	-0,003	-----	-----	-0,110	-0,107
	Média	0,006	-----	-----	-0,058	-0,064
Plântulas	6Pgdh-1	-0,125	0,156	0,250	0,401	0,467
	Pgi-2	-0,018	0,083	0,99	0,207	0,221
	Mdh-1	-0,010	0,134	0,142	-0,024	-0,012
	Mdh-2	-0,003	-0,003	0,001	-0,043	-0,040
	Média	-0,024	0,160	0,190	0,283	0,300

Os coeficientes de coancestralidade (TABELA 3), entre SPop's ($\hat{\theta}_p$), foram baixos para os adultos, em todos os locos, com média de 0,006. Para as plântulas, todos os $\hat{\theta}_p$ foram negativos, inclusive para a média, estatisticamente não diferentes de zero. Valores negativos de $\hat{\theta}_p$

são decorrentes de correlações intraclases maiores do que entreclases, ou mais especificamente, as plântulas dentro das SPop's são geneticamente mais diferentes entre si do que entre SPop's. Estes valores negativos também sugerem que as frequências alélicas das plântulas não se adequaram ao modelo aleatório de Cockerham, o qual assume que

as variações nas freqüências gênicas devem-se exclusivamente à deriva genética. É possível que as isoenzimas aqui avaliadas estivessem ligadas a locos seletivamente ativos, vindo assim, a expressar-se de forma igualmente seletiva, o que por sua vez, levou à inadequação do marcador ao modelo.

Devido aos baixos valores de divergência observados entre as SPop's, para adultos e plântulas, as diferenças entre as SPop's podem ser consideradas irrelevantes, e portanto, ambas são semelhantes do ponto de vista genético. Tal resultado era esperado, tendo em vista que 130 metros, entre SPop's, é uma distância muito curta para causar divergências genéticas por deriva, em uma espécie de dispersão hidrocórica e zoocórica e polinização entomofílica (LOVELESS & HAMRICK, 1984; HAMRICK, 1989). É esperado que o fluxo gênico entre as SPop's seja intenso, homogeneizando a variabilidade genética e reduzindo os efeitos aleatórios da deriva genética. Concomitantemente, HAMRICK (1989) afirma que populações arbóreas tropicais, de cruzamento, dióicas, de polinização entomofílica e de dispersão de sementes a longas distâncias (hidrocoria e zoocoria), apresentam pouca divergência entre suas populações, mantendo a maior diversidade dentro das populações. Nesse contexto, HAMRICK & GODT (1990), em revisão de literatura sobre diversidade isoenzimática em espécies de plantas, observaram que as preferencialmente alógamas, em média, mantêm mais de 78% de sua variabilidade dentro das populações.

O \hat{f} e \hat{F} , para o loco 6Pgdh-1, dos indivíduos adultos, apresentaram um pequeno excesso de homozigotos (0,079 para ambos os índices), contudo, estes índices foram em torno de 5 vezes menores do que a homozigosidade obtida para as plântulas no mesmo loco (0,467 e 0,401, respectivamente). O loco Pgi-2 apresentou excesso de homozigotos para as plântulas e de heterozigotos para os adultos. Já, os locos Mdh-1 e Mdh-2, apresentaram valores negativos muito próximos a zero, para as plântulas, e um expressivo excesso de heterozigotos para os adultos. Este comportamento sugere para todos os locos e para a média, a existência de seleção entre a fase de plântula e a fase adulta, pois os adultos sempre apresentam a tendência de conter mais heterozigose, mesmo considerando-se que o loco 6Pgdh-1 tenha apresentado excesso de homozigose em ambas as gerações.

As médias de \hat{f} e \hat{F} , para adultos, foram muito próximas a zero, indicando o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) nas SPop's. Para plântulas, estes valores foram positivos e altos, apontando desvios do EHW e accentuada endogamia na população, que no caso de *G. americana*, que é dióica, só pode ser fruto de cruzamentos entre aparentados. Desvios do EHW e cruzamentos endogâmicos já eram previstos pelas hipóteses iniciais do trabalho, dado que a população ocupa uma área restrita (7,2 ha), a espécie é perene, de vida longa, dióica, com evidências de apomixia e o tamanho da população não é infinito (125 indivíduos).

Finalizando, a magnitude de \hat{f} e \hat{F} , em todos os locos e na média, foi muito próxima, levando a entender que a endogamia na população (\hat{F}) é muito bem explicada pela endogamia contida dentro das SPop's (\hat{f}), ou seja, os níveis de fixação alélica são semelhantes, para os mesmos locos, nas duas SPop's, apontando que ambas são similares do ponto de vista genético. Este resultado reforça a hipótese de que as SPop's são homogêneas, portanto, subunidades de uma mesma população.

O coeficiente de coancestralidade entre plantas, dentro de famílias, dentro de SPop's ($\hat{\theta}_F$), foi em média alto (0,160), revelando a existência de cruzamentos entre aparentados. Em plântulas de meio irmãos, originadas de pais sem nenhum grau de parentesco, o valor máximo assumido por $\hat{\theta}_F$ é de 0,125 (1/8); valores acima indicam a existência de cruzamentos entre aparentados. Segundo REIS (1996), o grau de parentesco, entre as famílias maternas ($\hat{\theta}_F$), pode ser melhor estimado por $\hat{\theta}_F'$, por retirar os efeitos de divergência dos níveis hierárquicos superiores que, neste caso, corresponde ao efeito das SPop's. Desse modo, a estimativa média de $\hat{\theta}_F'$ foi de 0,190, reforçando o resultado observado para $\hat{\theta}_F$, ou seja, algumas plântulas foram geradas por cruzamentos entre aparentados.

A análise da estrutura genética das SPop's de *G. americana* permite afirmar que ambas compartilham o mesmo conjunto gênico e constituem uma só população, assim, rejeita-se a segunda hipótese, pois: a) não existem alelos exclusivos nas SPop's;

SEBBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. & VENCovsky, R. Estrutura genética de supopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em mata ciliar a partir de isoenzimas.

b) a divergência genética entre SPop's (θ_p) é insignificante (< 1 %); c) a variabilidade genética está distribuída dentro das SPop's e, d) a endogamia dentro das SPop's (\hat{f}) é grandemente explicada pela endogamia total da população (\hat{f}). A partir desse resultado, procedeu-se à análise conjunta das duas SPop's como sendo uma única população, através dos índices de diversidades intrapopulacionais.

4.3 Variabilidade Genética dentro da População

A caracterização da variabilidade genética dentro da população foi realizada pelo número médio de alelos por locos (A), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade média observada (H_o) e a heterozigosidade média esperada (\hat{H}_e) segundo expectativas do EHW (TABELA 4). Na referida tabela é apresentado também o tamanho médio da amostra (N).

TABELA 4 - Índices de diversidade intrapopulacionais em população de adultos e plântulas de *G. americana*.

	Adultos	Plântulas
A	1,63 (0,260) *	1,63 (0,260)
P (0,99)	50,0%	50,0%
N	41,8 (0,200)	277,5 (5,700)
H_o	0,195 (0,068)	0,105 (0,055)
\hat{H}_e	0,182 (0,054)	0,149 (0,083)

(*) Intervalo de confiança.

O número médio de alelos por locos (A), corresponde a uma medida de variabilidade dentro de locos, ou seja, é uma medida de riqueza alélica, já a porcentagem de locos polimórficos é uma medida de variabilidade entre locos dentro de indivíduos. As estimativas de A apresentaram-se baixas e não variaram entre adultos e plântulas (1,63 ± 0,260). Ressalta-se que para a estimativa de A consideraram-se todos os locos, monomórficos e polimórficos, e como 50% dos locos eram monomórficos, o valor estimado apresentou-se baixo. Caso esta estimativa seja feita apenas com os locos polimórficos, A sobe para 2,25 (0,25), o que pode ser considerado um número relativamente alto de alelos por locos. 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.

A porcentagem de locos polimórficos (P) foi de 50% e igualmente à estimativa de A também não variou entre adultos e plântulas. Comparando-se a magnitude desse índice ao encontrado para espécies vegetais, 36,8% (HAMRICK *et al.*, 1979) e 50% (HAMRICK & GODT, 1990), pode-se considerar que a população de *G. americana* apresenta um polimorfismo relativamente alto.

Entretanto, comparando-se as estimativas de P encontradas em *G. americana* com duas espécies arbóreas tropicais comuns, também da família Rubiaceae, *Alseis blackiana* (89,3%) e *Psychotria horizontalis* (49,5%), estudadas por HAMRICK & LOVELESS (1986), observam-se valores bem inferiores à primeira espécie, mas muito próximos à segunda. A análise das estimativas de P mostram que *G. americana* apresenta um grau de polimorfismo médio, isto é, a variação entre locos é relativamente boa, tornando a população favorável à conservação genética.

A heterozigosidade observada (H_o) foi alta para os adultos (0,195) e baixa para as plântulas (0,105). Já a heterozigosidade média esperada (\hat{H}_e) foi alta para ambos os adultos e as plântulas (0,182; 0,149, respectivamente). A estimativa de H_o foi superior a \hat{H}_e , nos adultos, e inferior nas plântulas, revelando excesso de heterozigotos para os primeiros e de homozigotos para os segundos, isto é, significa que a heterozigosidade observada nos adultos foi maior que a esperada se a população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg, contrariamente ao que ocorreu com as plântulas. Observa-se pelos resultados, indícios de seleção em favor dos heterozigotos entre a fase de plântula e a

fase adulta, reforçando o observado pela estatística F, obtidos da análise de variância (\hat{f} e \hat{F} , TABELA 3).

Comparando-se H_e , obtido para adultos e plântulas de *G. americana*, com os encontrados em espécies vegetais, 0,141 (HAMRICK *et al.*, 1979), ao nível de populações de espécies arbóreas, 0,149, e de espécies arbóreas tropicais, 0,109 (HAMRICK & GODT, 1990), observa-se grande superioridade nos valores aqui encontrados. Todavia, quando se compara H_e , com espécies arbóreas tropicais de alta densidade, da família Rubiaceae, 0,374 (*Alseis blackiana*) e 0,152 (*Psychotria horizontalis*) e na média de 16 espécies arbóreas tropicais comuns, 0,211 (HAMRICK & LOVELESS, 1989), fica claro que a heteroziguidade de *G. americana* foi bem inferior à encontrada para a primeira espécie, superior à segunda e próxima à terceira. MORAES (1993), estudando plântulas de *Miracrodruon urundeuva*, espécie também dióica, em duas populações, obteve heteroziguidades (0,140 e 0,160) próximas às encontradas aqui. Tais resultados mostram que *G. americana* apresenta uma heteroziguidade média, possibilitando assim, um grande número de novas recombinações genotípicas, pelos cruzamentos, favorecendo a conservação *in situ* da população.

No entanto, comparando-se H_e , dos adultos, relativamente à encontrada por HILL *et al.* (1978), para três espécies arbóreas ribeirinhas amazônicas,

0,100 a 0,425 para *Aeschynomene sensitiva* Sw. var. *amazonica* Rudd., 0,184 a 0,364 para *Aeschynomene sensitiva* Sw. var. *sensitiva* Rudd e 0,333 a 0,460 para *Mimosa pigra* L.; observam-se valores médios muito superiores aos encontrados para *G. americana*. HILL *et al.* (1978) também observaram que as populações localizadas à jusante do rio quase sempre apresentavam níveis mais altos de heteroziguidade do que as localizadas à montante, atribuindo essa característica à dispersão hidrocórica. No caso de *G. americana*, que é típica de ecossistemas ciliares e a dispersão também é hidrocórica, seria interessante complementar seu estudo através da avaliação de outras populações ao longo do rio Moji-Guaçu, objetivando detectar a extensão do fluxo gênico pela água.

O índice de fixação de Wright (\hat{f}), obtido para adultos e plântulas (TABELA 5), corresponde ao \hat{F} obtido da análise de variância. Este índice mede a redução da heteroziguidade, relativamente ao esperado em uma população panmítica. Valores de \hat{f} iguais a zero indicam que a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), ou seja, que os acasalamentos estão ocorrendo de forma aleatória, e não há endogamia na população. Contudo, valores significativamente maiores do que zero indicam excesso de homozigotos e deficiência de heterozigotos, e os significativamente menores do que zero, excesso de heterozigotos e deficiência de homozigotos, portanto, desvios do EHW.

TABELA 5 - Índices de fixação de Wright (\hat{f}) para plantas adultas e plântulas em 4 locos polimórficos em *G. americana*.

	Plantas Adultas	Plântulas
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 & HORVITZ (1953), e a média pelo teste Z (entre parênteses é apresentado o erro padrão da média).

Nas plântulas, o \hat{f} foi baixo, negativo e, estatisticamente não diferente de zero para os locos Mdh-1 e Mdh-2, porém, para os locos 6Pgdh-1, Pgi-2 e para a média, foi alto, positivo e, significativamente, diferente de zero, mostrando excesso de homocigotos e que as frequências alélicas observadas se desviam das esperadas, segundo os pressupostos de Hardy-Weinberg. Desvios do EHW, implicam que a população está subdividida, reprodutivamente, em grupos com certo grau de parentesco (FUTUYMA, 1992). Possivelmente a subdivisão esteja associada à existência de estruturação familiar dentro da população, ou a acasalamentos preferenciais decorrendo do assincronismo na antese das flores masculinas e femininas, ou, ainda, ao comportamento dos polinizadores, visitando sempre as mesmas plantas (CRESTANA, 1993).

Comparando a média de \hat{f} , entre adultos e plântulas, observa-se endogamia acentuada nas plântulas e um pequeno excesso de heterocigotos nos adultos, apontando, concordantemente aos resultados já observados, a existência de seleção em favor de heterocigotos, entre a fase de plântula e a adulta. A seleção dá a entender que os cruzamentos, na população, geram uma grande quantidade de sementes endogâmicas a cada ciclo reprodutivo, mesmo considerando-se que as plantas adultas contenham alta heterocigosidade e estejam em EHW (REIS, 1996). Os dados mostram que a seleção natural elimina as sementes endogâmicas, permitindo que só sementes heterocigóticas desenvolvam indivíduos adultos. Concordantemente, CRESTANA (1993), observou altas taxas de mortalidade entre plântulas de *G. americana*. Provavelmente, trata-se de uma estratégia adaptativa da espécie, liberando uma grande quantidade de sementes endogâmicas à disposição da seleção natural, porém, permitindo apenas que descendentes heterocigóticos se estabeleçam na população e venham a se reproduzir, garantindo a manutenção dos níveis de variabilidade da população. Em concordância com os resultados aqui encontrados, MURAWSKI (1995), comparou o \hat{f} entre adultos e plântulas em várias espécies arbóreas tropicais e observou que os níveis de fixação alélica eram quase sempre superiores nas plântulas, comparativamente às plantas adultas. No entanto, LEPSCH-CUNHA (1996), estudando

Couratari multiflora, na Amazônia, e MURAWSKI *et al.* (1994), estudando *Shorea congestiflora*, no Sri Lanka, encontraram valores de \hat{f} maiores na fase adulta, relativamente à fase de plântula, indicando a necessidade de mais estudos neste campo, a fim de se conhecer melhor a ação da seleção entre a fase juvenil e adulta.

A endogamia expressa pelo \hat{f} , para as plântulas, provavelmente está associada à existência de estruturação genética espacial, dado que *G. americana* é dióica, e portanto, o acasalamento entre aparentados é a única forma de gerar endogamia. MORAES (1993), estudando plântulas de uma espécie dióica - *M. urundeuva*, em duas populações, encontrou valores altos de \hat{f} (0,606 - Bauru; 0,342 - Selvíria), atribuindo esses resultados à existência de parentesco entre indivíduos dentro das populações. O autor observou que a população de Bauru era muito mais endogâmica que a de Selvíria, pressupondo para a primeira, maior grau de estruturação familiar.

Finalmente, considerando os altos valores de \hat{H}_e , a aderência das frequências genotípicas ao EHW, abordada a partir do \hat{f} , para os adultos, e as evidências de seleção em favor de heterocigotos, pode-se considerar a população de *G. americana* como potencialmente apta para a conservação *in situ*. Estes resultados indicam a possibilidade da espécie ampliar sua variabilidade genética através de novas recombinações genotípicas, o que se refletirá em um aumento no seu potencial adaptativo, portanto, evolutivo. O potencial evolutivo da população permitirá a adaptação às mudanças ambientais futuras, que por ventura poderão advir, dado o grande número de novas recombinações genotípicas, possíveis de ocorrer, para manutenção da variabilidade genética detectada. Assim, fica claro o potencial da população para a conservação *in situ* e utilização para a coleta de sementes, visando à recuperação de matas ciliares degradadas.

5 CONCLUSÕES

O estudo das subpopulações de *G. americana*, a partir de dados de isoenzimas, possibilitou as seguintes conclusões:

SEBBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. & VENCOVSKY, R. Estrutura genética de supopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em mata ciliar a partir de isoenzimas.

- a análise da estrutura genética das subpopulações revelou que a variabilidade genética se encontra quase toda distribuída dentro das subpopulações e apenas pequena parte dela é distribuída entre as subpopulações, e a análise das frequências alélicas mostrou que ambas as subpopulações compartilham os mesmos genes, conseqüentemente, ambas constituem subunidades de uma mesma população;
- a análise da variabilidade genética dentro da população a partir das plantas adultas evidenciou níveis relativamente altos de heterozigiosidade (\hat{H}_e), se comparados à média de outras espécies arbóreas tropicais estudadas. Entretanto, as análises das plântulas mostraram níveis baixos de variabilidade genética. A alta heterozigiosidade observada para os adultos é de valor relevante, visto que permite novas recombinações genotípicas, portanto, ampliação da plasticidade adaptativa da espécie às futuras mudanças ambientais e à colonização de novas áreas. Já, a baixa heterozigiosidade nas plântulas, evidencia a existência de cruzamentos endogâmicos, refletidos nos altos índices de fixação (\hat{f} e \hat{F});
- os altos níveis de heterozigiosidade nos adultos, combinados com a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém, 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, e
- verifica-se, pela análise dos resultados gerais, que a população de *G. americana* pode ser usada para a conservação genética *in situ* e para a recuperação de áreas degradadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, S. A. *et al.* 1991. *Eletroforese de proteínas e fungos em essências florestais*. Viçosa, UFV. 242p.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R. & GARAY, A. A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer species. *Evolution*, San Francisco, 48(2):437-453.
- BAWA, K. S. & O'MALLEY, D. M. 1987. Estudios genéticos y de sistemas de cruzamiento en algunas especies arbóreas de bosques tropicales. *Revista de Biología Tropical*, Costa Rica, 35(1):177-188. (Supl.)
- BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. & JAROSZ, A. M. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems. In: SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P. S (eds.) *Isozymes in plant biology*. Portland, Dioscorides Press. p. 73-86.
- CARVALHO, P. E. R. 1994. *Espécies florestais brasileiras; recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira*. Brasília, EMBRAPA-CNPQ. 640p.
- CHELIAK, W. M. & PITTEL, J. A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. *Information Report Pi - X*, Chalk River, (42):1-49.
- CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L. & ALLARD, R. W. 1978. Estimation of life cycle components of selection in a experimental plant population. *Genetics*, Washington, 89:765-92.
- COCKERHAM, C. C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution*, San Francisco, 23:72-84.
- CONKLE, M. T. *et al.* 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds; a laboratory manual. Berkeley, USDA, Forest Service. 18p. (General Technical Report PSW, 64)
- CRESTANA, C. de S. M. 1993. *Biologia reprodutiva de Genipa americana L. (RUBIACEAE) na Estação Ecológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo*. Rio Claro, UNESP. 222p. (Tese de Doutorado)
- DIAS, L. A. dos S. & KAGEYAMA, P. Y. 1991. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. *Agrotropica*, Ilhéus, 3(3):119-27.
- FUTUYMA, D. J. 1992. *Biologia evolutiva*. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. 631p.
- GIBBS, P. E. & LEITÃO FILHO, H. F. 1978. Composição florística de uma área de mata ciliar nas proximidades de Moji-Guaçu, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 1(1):151-6.
- _____; _____. & ABBOTT, R. J. 1980. Aplicação do método dos quadrantes no levantamento florístico de uma mata ciliar em Moji-Guaçu, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 3:17-22.

SEBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. & VENCovsky, R. Estrutura genética de supopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em mata ciliar a partir de isoenzimas.

- HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B. & MITTON, J. B. 1979. Relationships between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, California, 10:173-200.
- HAMRICK, J. L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M. *et al.* *Genetics and conservation*. Menlo Park, California, Benjamin Cummings Publishing Company. p. 335-348.
- _____. & LOVELESS, M. D. 1986. Isozyme variation in tropical trees; procedures and preliminary results. *Biotropica*, St. Louis, 18:201-207.
- _____. 1989. The genetic structure of tropical tree populations; association with reproductive biology. In: BOCK, J. H. & LINHART, Y. B. (eds.) *The evolutionary ecology of plants*. Boulder, USA, Westview Press. p. 129-146.
- HAMRICK, J. L. 1989. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P. (eds.) *Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations*. Chapman and Hall Ltd. p. 87-105.
- _____. & GODT, M. J. W. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D. *et al.* (eds) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Massachusetts, Sinauer, Sunderland. p. 43-63.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D. A. 1976. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam, North-Holland Publ. Co. 17p.
- HILL, R. J. *et al.* 1978. Estudo eletroforético da dinâmica de variação genética em três taxas Ribeirinhas ao longo do Rio Solimões, América do Sul. *Acta Amazônica*, Manaus, 8(2):183-199.
- KAGEYAMA, P. Y. 1987. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. *IPLEF*, Piracicaba, (35):7-37.
- KEPHART, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes; a comparative analysis of techniques. *American Journal of Botany*, Lancaster, 77(5):693-712.
- KÖPPEN, W. 1948. *Climatologia*. México, Editora Fundo de Cultura Econômica. 207p.
- LEPSCH-CUNHA, N. 1996. *Variabilidade genética intrapopulacional de duas espécies de baixa densidade na Amazônia Central: Couratari multiflora (J.E. Smith) Eyma e Couratari guianensis Aublet*. Item 1. de Resultados da Dissertação "Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia Central". Piracicaba, ESALQ/USP. 147p. (Dissertação de Mestrado)
- LI, C. C. & HORVITZ, D. G. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*, 5:107-117.
- LIENGSIRI, C.; YET, F. C. & BOYLE, T. J. B. 1995. Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. in Thailand. *Forest Ecology and Management*, 74:13-22.
- LOVELESS, M. D. & HAMRICK, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, California, 15:65-95.
- _____. 1987. Distribucion de la variacion en espécies de arboles tropicales. *Revista de Biología Tropical*, Costa Rica, 35(1):165-75. (Supl.)
- MANTOVANI, W. *et al.* 1989. Estudo fitossociológico de áreas de matas ciliar em Moji-Guaçu, SP, Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR, São Paulo, abr. 11-15, 1989. Campinas, Fundação Cargill. p. 235-267.
- MORAES, M. L. T. 1993. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler. Piracicaba, ESALQ/USP. 139p. (Tese de Doutorado)
- MURAWSKI, D. A.; DAYANANDAN, B. & BAWA, K. S. 1994. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan Tropical Rain Forest. *Biotropica*, St. Louis, 26(1):23-29.
- MURAWSKI, D. A. 1995. Reproductive biology and genetics of tropical trees from a canopy perspective. In: LOWMAN, M. D. & NADKARMI, N. M. *Forest canopies*. Academic Press. p. 457-493.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 70(12):3321-3323.

SEBBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. & VENCOVSKY, R. Estrutura genética de supopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em mata ciliar a partir de isoenzimas.

- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press. 512p.
- REIS, M. S. 1996. *Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (Euterpe edulis M.)*. Piracicaba, ESALQ/USP. 210p. (Tese de Doutorado)
- ROBERDS, J. H. & BROTSCHOL, J. V. 1985. Linkage desequilíbrio among allozyme loci in natural populations of *Liriodendron tulipifera* L. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 34:4-5.
- S.A.S. INSTITUTE. 1985. *SAS STAT; guide for personal computers, version 6.03*. Cary, N.C., SAS Institute Inc. 943p.
- SEBBEN, A. M. 1997. *Estrutura genética de subpopulações de Genipa americana L. (RUBIACEA) a partir de isoenzimas*. Piracicaba, ESALQ/USP. 107p. (Dissertação de Mestrado)
- SWOFFORD, D. L. & SELANDER. 1989. *Byosys-1; a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics*. Illinois, Illinois Natural History Survey. 43p. (Release 1,7)
- VENCOVSKY, R. 1992. Análise de variância de frequências alélicas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE GENÉTICA, 10, Rio de Janeiro. *Proceedings... Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 15(1):53-60. (Supl.)
- WEEDEN, N. F. & WENDEL, J. F. 1990. Genetic of plant isozymes. In: SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P. S. *Isozymes in plant biology*. Chapman and Hall Ltd. p. 46-67.
- WEIR, B. S. 1990. *Genetic data analysis. methods for discrete population genetic data*. North Carolina State University, Sinauer Associates Inc. Pub., Sunderland, Massachusetts. 377p.
- WRIGHT, J. A. 1993. *Conservacion ex situ de espécies nativas en Colombia*. Colombia, Smurfit Carton de Colombia. 6p. (Investigaciones Forestales, 159)
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, San Francisco, 19:395-420.
- YAMADA, M. M. & GURIES, R. P. 1989. *A manual for starch gel electrophoresis: new chocolate lovers edition*. Madison, Department Forestry of Wisconsin. 22p. (Staff Paper Series, 39)