

ESTRUTURA GENÉTICA DE SUBPOPULAÇÕES DE
***Genipa americana* L. (RUBIACEAE) A PARTIR DE**
ISOENZIMAS

ALEXANDRE MAGNO SEBBENN

Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. PAULO YOSHIO KAGEYAMA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências: Área de concentração Ciências Florestais.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Março - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Sebbenn, Alexandre Magno

Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas / Alexandre Magno Sebbenn. - - Piracicaba, 1997.

107 p.: il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.

Bibliografia.

1. Eletroforese 2. Genética Florestal 3. Isoenzima 4. Jenipapo 5. Mata ciliar 6. População de planta 1. Título

CDD 634.97352

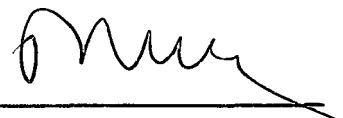
**ESTRUTURA GENÉTICA DE SUBPOPULAÇÕES DE
Genipa americana L. (RUBIACEAE) A PARTIR DE
ISOENZIMAS**

ALEXANDRE MAGNO SEBBENN

Aprovada em: 07/05/1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama	CIC: 028693149-49	ESALQ/USP
Prof. Dr. Roland Vencovsky	CIC: 015935608-34	ESALQ/USP
Prof. Dr. Edson Seizo Mori	CIC: 966407238-91	UNESP/Botucatu



Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

Orientador

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho e contribuíram para esta etapa tão importante da minha vida, em especial:

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, pela orientação e grande oportunidade na realização desta importante etapa de minha capacitação profissional;

Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky, pela coorientação, sugestões nas análises dos dados e valiosas discussões sobre princípios e conceitos de genética;

À PqC. Dra. Ana Cristina Machado Siqueira, pelo apoio e incentivo à minha realização profissional;

À Rita de Cássia Itália Rafael, pelos bons momentos, auxílio no campo e sugestões na redação;

À PqC. Dra. Cybele de Souza Machado Crestana, pelas discussões e esclarecimentos sobre biologia reprodutiva;

Aos técnicos do LARGEA, Elza, Gelson e Veridiana, pelo apoio logístico no laboratório;

A todos os funcionários da Estação Experimental de Mojiguaçu, pela ajuda no trabalho de campo;

Ao PqC. Marco Antonio de Oliveira Garrido, pelo incentivo institucional;

À CAPES, pela concessão da bolsa;

Aos colegas de Pós-Graduação do LARGEA, que contribuíram discutindo conceitos, questionando metodologias e auxiliando no trabalho de campo.

*Isto nós sabemos
Todas as coisas estão ligadas
Como o sangue que une uma família...
Tudo o que afeta a terra
Afeta os filhos e filhas da terra.
O homem não teceu a teia da vida;
Ele é apenas um fio dela.
Tudo o que ele faz à teia
Ele faz a si mesmo.*

(Ted Perry) *

*** F. Capra *apud* C.C Aveline (Planeta -
Edição 297 - Ano 25 - nº 6 - junho 1997)**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
SUMÁRIO.....	VII
RESUMO.....	IX
SUMMARY.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. A Espécie <i>Genipa americana</i> L.....	3
2.2. Eletroforese de Isoenzimas.....	6
2.3. Variabilidade Genética.....	8
2.4. Sistema Reprodutivo.....	13
2.5. Apomixia.....	16
2.6. Distribuição Espacial dos Genótipos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. MATERIAL.....	22
3.1.1. Caracterização do Local de Estudo.....	22
3.1.2. Tamanho da Amostra.....	23
3.2. MÉTODO.....	23
3.2.1. Coleta e Transporte das Amostras.....	23
3.2.2. Amostras para Eletroforese de Isoenzimas.....	24
3.2.3. Extração das Enzimas.....	24
3.2.4. Procedimentos de Eletroforese.....	25
3.2.5. Procedimento de Coloração dos Géis.....	27
3.2.6. Determinação do Protocolo da <i>G. americana</i>	28

3.2.7. Análise Estatística.....	31
3.2.7.1. Variabilidade Genética.....	31
3.2.7.2. Sistema Reprodutivo.....	42
3.2.7.3. Distribuição Genotípica Espacial.....	48
3.2.7.4. Estimativa do Fluxo Gênico (\hat{N}_m).....	49
3.2.7.5. Tamanho Efetivo da População (\hat{N}_e).....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. Sistemas Isoenzimáticos.....	52
4.2. Variabilidade Genética.....	54
4.2.1. Frequências Alélicas.....	54
4.2.2. Estrutura Genética das SPop's.....	55
4.2.3. Índices de Diversidade Intrapopulacionais.....	59
4.3. Sistema Reprodutivo.....	65
4.3.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	65
4.3.2. Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW).....	67
4.3.3. Aderência dos Dados ao Modelo Multilocos.....	68
4.3.4. Taxa de Cruzamento.....	71
4.3.5. Apomixia em <i>G. americana</i>	74
4.4. Distribuição Espacial dos Genótipos.....	78
4.5. Fluxo Gênico Entre SPop's (\hat{N}_m).....	82
4.6. Tamanho Efetivo da População (\hat{N}_e).....	82
5. CONCLUSÕES.....	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
7. ANEXOS.....	101

RESUMO

Foram estudados a estrutura genética, o sistema reprodutivo, a distribuição genética espacial, o fluxo gênico e o tamanho efetivo populacional de duas subpopulações naturais de *Genipa americana* L., situadas na mata ciliar do Rio Mojiguaçu, SP, denominada de "Mata da Figueira", de propriedade do Instituto Florestal do Estado de São Paulo, a partir da eletroforese de isoenzimas, discutindo-se sobre as possíveis estratégias de conservação genética *in situ* e utilização da população como "área para coleta de sementes", visando recuperação de áreas degradadas.

A partir da análise de isoenzimas, obtiveram-se 13 alelos distribuídos entre 8 locos, onde 4 eram monomórficos e 4 polimórficos. O coeficiente de coancestralidade de Cockerham ($\hat{\theta}_p$) revelou que 99,4% da variabilidade genética dos indivíduos adultos se encontra dentro das subpopulações e 100% para as plântulas. Os índices de fixação de Wright foram, em média, negativos para os adultos ($\hat{f} = -0,061$; $\hat{F} = -0,055$) e positivos para as plântulas ($\hat{f} = 0,369$; $\hat{F} = 0,341$), 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 grandemente explicada pela endogamia contida dentro das subpopulações. Os resultados mostram 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 porcentagem de locos polimórficos ($P = 50\%$), para adultos e plântulas. A heterozigosidade média esperada

foi alta para adultos e plântulas ($\hat{H}_e = 0,182$; $\hat{H}_e = 0,149$, 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.

As taxas de cruzamentos multilocos (\hat{i}_m) foi de 0,816, a unilocos (\hat{i}_s) de 0,617 e a diferenças $\hat{i}_m - \hat{i}_s$ de 0,199, sugerindo que nesse ciclo reprodutivo, em média, 81,6% das plântulas foram geradas por cruzamentos, sendo 61,7 entre indivíduos não endogâmicos e 19,9% entre endogâmicos. A diferença de $\hat{i}_m - 1,0$, foi de 18,4%, o que no caso de uma espécie monoica seria atribuído a autofecundação. Entretanto, como *G. americana* é dióica e o modelo multilocos confunde autofecundação com apomixia, esta diferença poderia ser atribuída a apomixia. Porém, o teste de χ^2 rejeitou a hipótese de apomixia, revelando inadequação dos dados a esse modelo, ou seja, um excesso de descendentes homozigóticos de mães heterozigóticas (> 50%). Esse fato não permite inferir a respeito da forma apomítica de reprodução. Por outro lado, indica a possível existência de seleção favorecendo os homozigotos na fase de plântula.

Os acasalamentos endogâmicos também foram detectada pelos índices de fixação de Wright e coeficientes de coancestralidade entre plantas, dentro de famílias ($\hat{\theta}_F$), sugerindo estruturação espacial na população. Contudo, as análises de autocorrelação espacial não revelaram estruturação genética significativa dentro das subpopulações. O fluxo gênico estimado na fase adulta das plantas foi alto, sugerindo intensa troca gênica dentro da população, permitindo o cruzamento entre indivíduos aparentados, localizados a grandes distâncias.

A estimativa do tamanho efetivo da população (\hat{N}_e) mostrou que a melhor estratégia para a coleta de sementes é a partir da colheita em um número maior de matrizes, aleatoriamente na população. Esta estimativa também mostrou que a área mínima viável para a conservação *in situ* da população, de *G. americana*, é de 24,7 hectares.

SUMMARY

The genetic structure, the mating system, the spatial genetic structure, the gene flow and the effective population size of two natural subpopulations of the tropical forest tree *Genipa americana* L. were studied using isoenzymes electrophoretic techniques. The study site was located at a Mojiguaçu river riparian forest, São Paulo State, Brazil, owned by the São Paulo Forest Institute.

The objectives of the research were to suggest possible strategies for *in situ* genetic conservation and for using the population as a seed provider for degraded land recuperation projects. Thirteen alleles distributed in eight loci were obtained in the research. Four of these loci were monomorphic and four were polymorphic. The genetic structure analysed by the Cockerham coancestry coefficient ($\hat{\theta}_p$) revealed that 99,4 % of the variability is distributed within the subpopulations. The Wright's *F* statistics, for the adult plants, revealed negative values for the average allele fixation within subpopulations ($\hat{f} = -0,061$) and for the population as a whole ($\hat{F} = -0,055$). In the seedlings analyses, the values were positive ($\hat{f} = 0,361$; $\hat{F} = 0,341$). The $\hat{\theta}_F$ estimate was 0,186, indicating the existence of endogamic mating. These results revealed that both subpopulations constitute a single population. The average allele number per loci was 1,63 and the polymorphic loci percentage was 50 % (99 % probability) for both adults and seedlings. The average estimated heterozygosity (\hat{H}_e) was high for adults (0,182) and for seedlings (0,149). The Wright fixation index (\hat{f}) was negative for adults (-0,071) and positive for the seedlings (0,320), suggesting deviation of heterozygote proportions from Hardy-Weinberg expectation for the seedlings, with probable endogamic mating and selection favouring the heterozygotes

between the seedling and adult phase. The multiloci (\hat{t}_m) and single loci (\hat{t}_s) were $\hat{t}_m = 0,816$ and $\hat{t}_s = 0,617$, respectively, indicating that in this mating cycle 61,7% of the seedlings analysed were generated from the mating of individuals not closely related to each other, 19,9% by mating of related individuals ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), and 19,4% probably by apomixy. However, the χ^2 test, designed to detect apomixy in the population did not reveal this. The existence of endogamic mating is coherent with the Wright's F statistics, but the spatial autocorrelation analysis did not detect statistically significant genetic structuration within the subpopulations. The gene flow between the subpopulation was high for adults, suggesting intense gene exchange, as expected, due to the short distance between the units, since the pollination is entomophilic. The population effective size revealed that the best strategy for seed collecting is from higher number of matrices, randomly within the populations. This estimate also showed that the minimum feasible area for *in situ* conservation of the *G. americana* population is 24,7 ha.

1. INTRODUÇÃO

As matas ciliares constituem um importante ecossistema, cuja função é preservar as margens dos rios, evitando a erosão e o conseqüente assoreamento, bem como fornecer alimentação para a fauna aquática. Tais matas têm um papel estratégico para conservação da biodiversidade, preservação da qualidade da água e formação de corredores genéticos entre as poucas florestas primárias existentes nas margens.

O ambiente ciliar, condicionando fatores meso e microclimáticos, possibilita a instalação de espécies de sub-bosques e de diversas formações florestais que se comportam como acessórias ou acompanhantes, funcionando como corredores de dispersão e mantenedores do fluxo gênico dentro das populações. No entanto, embora sob proteção do Código Florestal Brasileiro, essas matas vêm sendo alvo de desmatamentos freqüentes, especialmente em decorrência à exploração agrícola e extração de madeira, resultando em longas faixas marginais desmatadas. De acordo com Kageyama & Dias (1982), tal prática leva ao desaparecimento de diversas espécies florestais em várias regiões, com sério comprometimento do potencial genético.

Essa situação mostra a necessidade imediata de estudos genéticos populacionais das espécies que compõem tais ecossistemas, para fins de conservação *in situ* ou utilização como “áreas para coletas de sementes”, objetivando à recuperação de áreas degradadas. Entretanto, dada a impossibilidade prática e econômica do estudo de todas as espécies que habitam os ecossistemas florestais, deve-se procurar amostrar aquelas que os representem, ou seja, que sirvam de modelos para essas comunidades.

Entre as espécies arbóreas tropicais adaptadas às matas ciliares, destaca-se a *Genipa americana*, cuja estrutura genética é adequada para representar espécies de dispersão hidrocórica e polinização entomofílica.

Devido às características adaptativas ao ambiente ciliar, combinadas com o rápido crescimento e abundante produção de sementes, a *G. americana* tem sido muito recomendada e utilizada na recuperação de áreas degradadas (Durigan & Nogueira, 1990; Almeida et al., 1994; Kageyama et al., 1994; Rodrigues et al., 1994a; Zelazowski & Lopes, 1994). Para estas atividades é fundamental que as sementes colhidas de um número de árvores matrizes mantenham níveis razoáveis de variabilidade genética e mínimos de endogamia. Tendo em vista que a variabilidade e a endogamia estão diretamente relacionadas ao tamanho efetivo da população (\hat{N}_e), conhecê-lo torna-se importante nas áreas que se pretende utilizar para coleta de sementes. Este parâmetro é de grande importância para delimitar a área mínima viável para conservação *in situ*, de uma espécie.

Tendo em vista o exposto, estudou-se a estrutura genética de duas subpopulações naturais de *G. americana*, a partir da eletroforese de isoenzimas, baseando-se nas seguintes hipóteses: i) que ambas as subpopulações foram formadas a partir de poucos migrantes vindos de populações à montante do rio através da hidrocoria e que, após se desenvolverem, 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 sub-unidades de uma mesma população.

Assim, os objetivos do presente estudo foram:

- a. caracterizar a estrutura genética das subpopulações;
- b. quantificar a variabilidade genética na população;
- c. estudar o sistema reprodutivo da espécie;
- d. estudar a distribuição espacial dos genótipos nas subpopulações;
- e. determinar o fluxo gênico entre subpopulações;
- f. estimar o tamanho efetivo da população.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Espécie *Genipa americana* L.

Genipa americana L. (Rubiaceae) tem como sinonímia botânica *Gardênia genipa* Sw (Lorenzi, 1992), *G. americana* var. *caruto* (H.B.K.) K. Schum e *G. caruto* H.B.K (Carvalho, 1994).

A espécie tem distribuição natural entre as latitudes 20^oN (México) a 20^oS (Brasil em São Paulo), ocorrendo em países como: México, Guatemala, El Salvador, Nicarágua, Costa Rica e Honduras, Santa Lúcia, Dominica, Trinidad e Tobago, Haiti e Guadalupe, Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Suriname, Venezuela e Brasil. No Brasil, a espécie ocorre nos estados do AC, AL, AM, BA (sul e sudeste), CE (Serra de Baturité e litoral), ES, GO (Ilha do Bananal), MA, MG (norte), MS, MT, PA, PE, PI, RJ, RO, SE, SP (norte e oeste), TO e no Distrito Federal (Carvalho, 1994).

A espécie caracteriza-se por apresentar 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). O tronco é reto e cilíndrico, normalmente com fuste curto (Carvalho, 1994). As folhas são simples, subcoriáceas, glabras, de 15 a 35cm de comprimento. A madeira é moderadamente pesada (densidade 0,68 g/cm³), flexível, compacta, fácil de trabalhar, de longa durabilidade quando não exposta ao solo e à umidade, alborno estreito e distinto, sendo empregada na construção civil, na marcenaria, na confecção de móveis e peças curvadas, obras de torno, coronhas de armas, batentes de portas e janelas, carrocerias, cabos de ferramentas e na carpintaria em geral (Lorenzi, 1992).

Seus frutos são comestíveis e muito apreciados e, quando ainda verdes, fornecem suco de cor azulada, muito consumidos e usados como corantes. Após o amadurecimento fornecem polpa comestível aproveitada *in natura* e na forma de doces; o fruto fermentado transforma-se em vinho e licor (Lorenzi, 1992; Carvalho, 1994).

A planta é heliófita, seletiva, higrófila, característica de florestas pluviais e semidecíduas situadas em várzeas úmidas e brejosas (Lorenzi, 1992). A espécie pode ocorrer em outras formações florestais, todavia, sempre em terrenos muito úmidos (Lorenzi, 1992; Carvalho, 1994). É encontrada tanto no interior da mata primária como nas formações secundárias e produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis (Lorenzi 1992; Crestana, 1993, Carvalho, 1994).

Segundo Lorenzi (1992), a floração vai de outubro a dezembro, porém, segundo Crestana (1993), de novembro a janeiro e para Carvalho (1994) de dezembro a fevereiro, no Estado de São Paulo.

O amadurecimento dos frutos vai de novembro a dezembro, quase simultaneamente com a nova florada (Lorenzi, 1992). Já, de acordo com Crestana (1993), os frutos amadurecem de dezembro a fevereiro e segundo Carvalho (1994), de janeiro a março, no Estado de São Paulo.

A dispersão dos frutos ocorre inicialmente por gravidade, posteriormente pela ação de mamíferos e roedores ou pela hidrocoria nos meses de cheia dos rios (Crestana, 1993; Carvalho, 1994).

Quanto ao sistema reprodutivo, *G. americana*, de acordo com Carvalho (1994), é preferencialmente monóica, ocorrendo no entanto, indivíduos masculinos. Contudo, Crestana (1993), após estudo minucioso das flores, classificou a espécie como dióica, concordantemente com as observações feitas por Bawa et al. (1985).

A visitação das flores inclui diversos insetos, tendo por polinizadores efetivos as mamangavas *Bombus morio* e *Epicharis rustica flava* (Crestana, 1993). Entretanto, Bawa et al (1985), observaram nas florestas tropicais da Costa Rica que a polinização ocorre a partir de abelhas pequenas e médias.

Nilsson (1989) e Durigan & Nogueira (1990), classificam a espécie como pioneira ou sucessional inicial, Rodrigues et al. (1994a; 1994b), como secundária inicial e Carvalho (1994) como secundária tardia, com características de clímax. Observação de

mudas em viveiro e plantios em testes de progênes, mostram pouco desenvolvimento da espécie a pleno sol, sugerindo que a espécie é no estágio sucessional secundária tardia. Por essas e por outras características, a espécie tem sido muito recomendada e utilizada em plantios mistos de áreas brejosas e degradadas (Almeida et al., 1994; Durigan & Nogueira, 1990; Rodrigues et al. 1994a; 1994b).

Nas matas ciliares, *G. americana* fornece abundante alimentação para a fauna (Lorenzi, 1992) e é capaz de suportar longos períodos de imersão, durante a época de cheia dos rios, apresentando a desvantagem de ser muito suscetível às geadas (Nilsson, 1989; Durigan & Nogueira, 1990). Barbosa et al. (1989), em estudo de modelos para recuperação de áreas degradadas na mata ciliar do rio Mojiguaçu, SP, observaram, nos ensaios de submersão em água, que as mudas de *G. americana* e *Inga vera* L. sobressaíram-se quanto ao maior tempo de sobrevivência.

Mazzoni-Viveiros (1989) afirma que a ocorrência de inundações periódicas nas matas ciliares impõe à flora desses ecossistemas mecanismos de sobrevivência adequados às condições de saturação hídrica e à conseqüente anoxia, citando a família Rubiaceae, mais especificamente *G. americana*, como representativa e adaptada a essas condições. A autora encontrou, também, características anatômicas no lenho, indicativas das possíveis tendências adaptativas às condições de saturação hídrica.

Durigan & Nogueira (1990) caracterizaram a espécie como de ocorrência em solos de alta fertilidade, tendo observado, em plantios de até 8 meses de idade uma sobrevivência de 100%, caracterizando-a como de rápido crescimento, com emissão de brotações laterais e relativa plasticidade, adaptando-se a solos menos férteis que os de sua ocorrência natural. Já, Lorenzi (1992), classificou a espécie como de desenvolvimento apenas moderado atingindo até três metros de altura em dois anos.

Demattê (1989), em estudo de matas ciliares, encontrou *G. americana* em florestas residuais às margens do Córrego Jaboticabal, no município de Guaíba, SP, bacia do Rio Mojiguaçu, que abrange o Córrego Jaboticabal. Mantovani et al. (1989), estudando a estrutura fitossociológica de três áreas ciliares do Rio Mojiguaçu, detectaram a presença de *G. americana* nas áreas denominadas “Mata do Português” e “Mata da Figueira”, pertencentes à Estação Ecológica de Mojiguaçu do Instituto Florestal. Bertoni & Martins (1987), estudando a composição florística de uma floresta ripária, também às

margens do Rio Mojiguaçu, Reserva Estadual de Porto Ferreira, localizada 100 km à jusante da “Mata da Figueira”, observaram a presença de *G. americana*.

Crestana (1993) encontrou na “Mata da Figueira”, Mojiguaçu, SP, uma densidade de 17,3 indivíduos de *G. americana* por hectare, o que coloca a espécie na classe das comuns (mais do que 4 indivíduos por hectare (Hamrick & Murawski, 1991)), porém, Bawa et al. (1985) citam a espécie como rara ou incomum em floresta tropical semidecídua da Costa Rica.

Quanto à conservação da espécie, segundo Wright (1993), a Smurfit Cartón del Colombia vem conduzindo programas de conservação genética *ex situ* com essências florestais nativas, desde 1971, incluindo dentre elas, a *G. americana*. Nas florestas colombianas *G. americana* está classificada na categoria das espécies em perigo de extinção.

2.2. Eletroforese de Isoenzimas

O maior impacto sobre a genética de populações foi promovido pelo desenvolvimento da técnica de eletroforese de isoenzimas, através da detecção de diferentes cargas, na variação entre proteínas solúveis (Weir, 1990). Esse método tem sido, nas duas últimas décadas, a ferramenta mais utilizada para a análise da estrutura genética de populações. Segundo Hamrick & Godt (1990), nos últimos vinte anos, mais de 700 espécies de plantas tiveram suas populações estudadas pela eletroforese. A habilidade para observar variação em locos isoenzimáticos tem também revolucionado as pesquisas no campo da genética bioquímica e evolutiva (Hamrick, 1989; Stebbins, 1989; Weeden & Wendel, 1989; 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).

O grande potencial da técnica, para 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 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 da proteína. Em um simples gel pode ser acomodado material de vários indivíduos (Harris & Hopkinson, 1976; Conkle et al., 1982; Wendel & Weeden, 1989; Alfenas, 1986 e 1991; Weir 1990).

A técnica apresenta vantagens sobre os métodos clássicos quantitativos na análise da estrutura genética de populações, que são: a herança genética das características detectadas poder ser facilmente demonstrada; a maioria dos locos são codominantes e as frequências gênicas podem ser calculadas, diretamente sem a necessidade de cruzamentos genéticos; as estimativas da variabilidade genética podem ser comparadas diretamente entre populações ou espécies; um conjunto de locos podem ser acessados usando-se pequena quantidade de material (Hamrick et al., 1979; Hamrick, 1989). Além disso, Cheliak & Pitel (1984) acrescentam que os marcadores genéticos não são associados às características fenotípicas observadas, sendo, portanto, neutros, ou seja, agem como variantes casuais não influenciadas diretamente pela seleção natural, permitindo a formulação de hipóteses relativas à quantidade, distribuição e manutenção da variabilidade genética. Outras vantagens seriam: permitir a caracterização da estrutura genética das populações, em pouco tempo, não exigir área experimental, não apresentar limite para o número de populações a serem ensaiadas e os custos equivalerem aos métodos quantitativos, além de as enzimas serem a expressão direta dos genes, o que aumenta a precisão das estimativas dos parâmetros genéticos (Alfenas, 1986; Stebbins, 1989).

Segundo Brown et al. (1989), a eletroforese de isoenzimas apresenta três vantagens nos estudos dos sistemas de acasalamentos em plantas, comparativamente aos marcadores morfológicos: 1) as isoenzimas são de expressão codominante; 2) vários locos enzimáticos são altamente polimórficos em muitas populações; e 3) as isoenzimas são de modo geral neutras, assim, não sofrem ação de forças seletivas.

Corder & Lopes (1993), estudando árvores adultas e progênes de *Eucalyptus spp.*, concluíram que as análises genéticas, a partir da eletroforese de isoenzimas, podem ser realizadas em qualquer fase de vida de sua existência, desde que se

conservem os indivíduos vivos em condições de campo e viveiro, tornando possível analisar com maior precisão o controle genético dos locos envolvidos, uma vez que teremos genótipos maternos (árvores adultas) e suas progênes, facilitando a compreensão dos estudos de genética de populações, do sistema reprodutivo, do fluxo gênico, além de ser uma valiosa ajuda no monitoramento genético de populações melhoradas.

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), Wendel & Weeden (1989), Yamada & Guries (1989) e Alfenas (1991).

Kephart (1990) compara e discute os métodos de eletroforese de isoenzimas utilizados em 25 laboratórios, focalizando as técnicas mais utilizadas para extração, coloração, preparo dos géis, tampões de cuba/gel, sistemas enzimáticos, condições de corridas e forma de interpretação dos géis.

2.3. 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. Segundo Bawa & O'Malley (1987), a estimativa da variabilidade genética em populações naturais é de fundamental importância para resolução de numerosos problemas no campo da biologia de populações.

O termo “população” se refere a um conjunto qualquer de elementos, sendo empregado por geneticistas de populações para descrever grupos de indivíduos sexuais que se associam por razões ecológicas e reprodutivas. Do ponto de vista genético, uma população é um grupo de indivíduos da mesma espécie, que se interacasalam e que, por isso, têm propriedades comuns tanto em termos de espaço como de tempo. O aspecto mais importante contido nessa descrição de “população” é a troca de genes que ocorre entre os seus membros. Sob este aspecto, toda a informação contida num grupo de indivíduos que se interacasalam, constitui, globalmente, o que se denomina reservatório ou conjunto gênico (“pool gênico”), que é reconstituído a cada geração (Mettler & Gregg, 1973).

A variabilidade genética natural manifesta-se ao nível molecular de indivíduo 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 permite adotar as estratégias de manejo mais adequadas para a conservação genética (Kageyama, 1987; Dias & Kageyama, 1991).

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 partida entre e dentro de populações (Hamrick, 1983; Loveless & Hamrick, 1987; Kageyama, 1987).

A 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). Segundo Hamrick (1983), a distribuição dessa variabilidade em populações naturais é influenciada principalmente pelo modo de reprodução, sistema de acasalamento, tamanho efetivo da população, distribuição geográfica e fluxo gênico, e ainda, segundo o autor, essa é estruturada no tempo e no espaço.

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, 1978; Levin, 1978).

A caracterização da variabilidade genética dentro das populações tem sido feita a partir dos índices de diversidade intrapopulacionais, tais como: porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por locos (A), número efetivo de alelos por locos (A_e) e heterozigosidade média esperada (\hat{H}_e) por loco (Hamrick, 1983; Hamrick, 1989). Outras medidas, algumas vezes usadas, são o número de alelos por locos polimórficos e a heterozigosidade média observada (H_o) por loco (Hamrick, 1989). No

entanto, os dois parâmetros mais utilizados comumente para essa quantificação são a proporção de locos polimórficos e a heterozigossidade média observada (Hamrick & Loveless, 1989; Stebbins, 1989). Os autores afirmam ainda, concordantemente com Hamrick & Godt (1990), que em média os trabalhos com espécies arbóreas tropicais mostram altos níveis de variação isoenzimática dentro das populações, relativamente aos níveis de variação entre populações.

Um loco é definido como polimórfico quando a frequência do alelo mais comum (p_i) é igual ou menor que 0,99. Essa definição é arbitrária, não existindo razão para que a distinção entre locos monomórficos e polimórficos não seja feita com $p_i = 0,95$ ou 0,995, ou ainda, por outro valor similar (Nei, 1987). Segundo o autor, essa estatística não é uma boa medida de variabilidade genética em amostras pequenas ($n \leq 50$) em que um pequeno número de locos é analisado, devido ao grande erro amostral e, portanto, a estimativa torna-se inútil.

Na Tabela 1 são apresentados alguns índices de diversidade dentro de populações para algumas espécies dióicas, espécies da família Rubiaceae e para o agrupamento de plantas em função de algumas características similares.

Tabela 1. Número de locos, porcentagem de locos polimórficos (P) e heterozigossidade média esperada (\hat{H}_e). Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Espécie ou características ecológicas	Nº de locos	P	\hat{H}_e
<i>Tecoyena pittieri</i> (S.) Standl ^{1,8}	26	38,5	0,186
<i>Alseis blackiana</i> ^{1,6}	26	89,7	0,374
<i>Psychotria horizontalis</i> ^{1,6}	20	50,0	0,152
<i>Psychotria faxlucens</i> ^{1,8}	20	40,0	0,198
<i>Miracrodruon urundeuva</i> ^{2,9}	5	66,7	0,243
<i>Cecropia obtusifolia</i> ^{2,11}	8	----	0,343 *
<i>Cecropia insignis</i> ^{2,5}	24	44,7	0,146
<i>Sorocea affilis</i> H. ^{2,10}	36	72,2	0,239
<i>Brosimum alicastrum</i> ^{2,5}	30	61,3	0,225
Espécies arbóreas tropicais ⁷	----	60,9	0,211
Todas espécies de plantas ³	----	36,8	0,141
Espécies arbóreas ⁴	17,0	50,0	0,149

* Valor aproximado; 1: Espécies da família Rubiaceae; 2 Espécies dióicas; 3: Hamrick et al. (1979); 4: Loveless & Hamrick (1984); 5: Hamrick & Loveless (1986a). 6: Loveless & Hamrick (1987); 7: Hamrick & Loveless (1989); 8: Hamrick & Murawsky (1991); 9: Moraes (1993); 10: Pérez-Nasser et al. (1993); 11: Alvarez-Buylla & Garay (1994).

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações é o produto da interação de vários fatores evolucionários. De importância primária são a seleção, tamanho efetivo de populações e a habilidade da espécie de dispersar pólen e sementes. Em geral, a seleção pode aumentar a diferenciação entre as populações devido a deriva genética. Por outro lado, espécies com intenso movimento de pólen e sementes têm menor diferenciação do que espécies com fluxo gênico restrito (Hamrick, 1989).

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; 1987) e estatística F de Wright (Wright, 1965). Essas estatísticas, apesar de fornecerem informações similares a partir de metodologias distintas, são um tanto complementares (Reis, 1996). A análise da variância fornece a distribuição da variabilidade genética em diversos níveis hierárquicos; assim, quanto mais níveis hierárquicos possuir a amostragem, mais informativa se torna a metodologia. A diversidade genética de Nei fornece, a partir de uma metodologia estatística simples, a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações. Finalmente, a estatística F fornecem os índices de fixações alélicas ao nível do total das populações, média dentro e entre populações, ou seja, fornece a probabilidade de dois genes tirados ao acaso, de diferentes níveis populacionais, serem idênticos por descendência. Reis (1996) utilizou simultaneamente as três metodologias para a análise de populações de *Euterpe edulis*, ressaltando que a análise de variância apresentam mais precisão por considerarem o processo amostral nas estimativas dos parâmetro genéticos..

Na Tabela 2 são apresentados valores médios para as estimativas de Nei (1973), alterados de Loveless & Hamrick (1984), para algumas espécies arbóreas tropicais e para algumas características ecológicas.

De acordo com Loveless & Hamrick (1987), um valor de \hat{G}_{ST} , em torno de 1,0, indica que a maior parte da variabilidade genética ocorre entre as populações, já um valor em torno de zero sugere que as populações não estão bem diferenciadas e que a variabilidade genética das espécies está dividida entre as populações. Ainda segundo os autores, o sistema de acasalamento está diretamente correlacionado com o coeficiente de diferenciação genético entre populações (\hat{G}_{ST}).

Tabela 2. Distribuição da variabilidade genética entre (\hat{G}_{ST}) e dentro (\hat{H}_s) de populações, para espécies ou características históricas de vida, alterados de Loveless & Hamrick (1984). Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	Nº de estudos	\hat{H}_T	\hat{H}_s	\hat{G}_{ST}
<i>Alseis blackiana</i> ^{1,3}	1	0,432	0,412	0,043
<i>Psychotria horizontalis</i> ^{1,3}	1	0,290	0,277	0,039
<i>Sorocea affilis</i> ^{2,3}	1	0,322	0,307	0,047
<i>M. urundeuva</i> ⁵	1	0,495	0,436	0,036
Acasalamento misto ⁴	48	0,242 (0,056)	0,174 (0,044)	0,243 (0,059)
Espécies de Cruzamento ⁴	76	0,251 (0,045)	0,214 (0,034)	0,118 (0,036)
Dióica ⁴	3	0,155 (0,066)	0,121 (0,012)	0,109 (0,054)
Facultativamente apomítica ⁴	16	0,356 (0,107)	0,282 (0,083)	0,205 (0,078)
Polinizada por abelhas grandes ⁴	8	0,393 (0,163)	0,304 (0,127)	0,224 (0,073)
Dispersão animal ⁴	18	0,243 (0,063)	0,141 (0,042)	0,398 (0,129)
Secundárias ⁴	47	0,227 (0,050)	0,178 (0,036)	0,184 (0,049)
Clímax ⁴	35	0,299 (0,057)	0,264 (0,053)	0,105 (0,036)
Espécies comuns ⁴	52	0,316 (0,093)	0,183 (0,036)	0,407 (0,219)

1: Espécie da família Rubiaceae; 2: Espécie dióica; 3: Loveless & Hamrick (1987); 4: Loveless & Hamrick (1984); Moraes (1993).

A estatística F têm sido muitas vezes utilizada para quantificar a estrutura genética de populações, visto que esta fornece o níveis de fixação alélica dentro das populações (\hat{F}_{IS}) entre populações (\hat{F}_{ST}) e total das populações (\hat{F}_{IT}). Esta estatística também infere sobre a aderência das populações ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, e, portanto, ao sistema de acasalamento. Segundo Alvarez-Buylla & Garay (1994), valores de F iguais a zero indicam que os genótipos da população se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores de F maiores do que zero indicam excesso de homozigotos e, valores menores do que zero, indicam excesso de heterozigotos. É importante ressaltar que F varia de -1 a +1, conseqüentemente, não é um coeficiente de endogamia que varia de 0 a +1, mas sim um índice de fixação alélica que serve como indicativo do grau de endogamia existente na população (Vencovsky, 1996; inf. pessoal).

Finalmente, a concentração de esforços na conservação genética de espécies arbóreas deve ser determinada pela distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, de modo a preservar o máximo de variabilidade das populações naturais. Ademais, a conservação genética de populações de plantas que apresentem pouco interesse na atualidade e cuja estrutura genética é conhecida, devem 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 (Liengsiri et al., 1995).

2.4. Sistema Reprodutivo

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 são essenciais para a compreensão dos padrões de fluxo gênico e diferenciação genética entre e dentro de populações (Bawa, 1974; Clegg, 1980; O'Malley & Bawa, 1987; Hamrick, 1989; Kirkpatrick et al., 1990).

Segundo O'Malley & Bawa (1987), o estudo detalhado do sistema reprodutivo das espécies arbóreas tropicais pode fornecer informações importantes sobre os padrões de acasalamentos, a dinâmica dos processos *microevolucionários* e as melhores formas para conservação e manejo dessas essências.

A suposição de acasalamentos aleatórios, da teoria de Hardy-Weinberg (EHW), faz o papel central da teoria de genética de populações, visto que a forma de acasalamento atua diretamente sobre a transmissão de genes de uma geração para outra; portanto, é o fator responsável pelas mudanças evolutivas de uma população. Entretanto, devido a essa suposição chave, o teorema de Hardy-Weinberg raramente pode ser aplicado em populações de plantas (Mettler & Gregg, 1973).

As plantas exibem uma ampla variedade de estruturas de acasalamentos, incluindo: a) sistema regular de endogamia e freqüente auto fertilização; b) acasalamentos

associativos negativos devido aos vários grupos de sistemas de incompatibilidade; e c) endogamia efetiva resultante do agrupamento de indivíduos relacionados dentro de uma pequena área de vizinhança (Clegg, 1980).

Nas populações obrigatoriamente exógamas (dióicas) o sistema mais comum de reprodução é aquele em que os acasalamentos são ao acaso (unidades panmíticas), posto que, um dado indivíduo tem igual probabilidade de acasalar-se com qualquer outro do sexo oposto, independente do seu genótipo (Mettler & Gregg, 1973). Esse sistema de reprodução é que emprega a diversidade genética ao extremo, constituindo um dispositivo de cruzamento que impede a autofecundação, mas não evita o acasalamento entre irmãos, o que é outra forma de gerar endogamia, porém, menos pronunciada (Allard, 1971).

A taxa de cruzamento pode ser estimada a partir de dados de isoenzimas pelo método dos momentos (Weir, 1990; Vencovsky, 1994) e de máxima verossimilhança (Ritland & Jain, 1981).

O modelo misto proposto por Ritland & Jain (1981) pressupõe que as populações se reproduzem por autofecundação e cruzamentos aleatórios (Ritland & Jain, 1981; Hamrick, 1989; Ritland, 1990), assumindo: (1) que os acasalamentos são devido a cruzamentos aleatórios ou autofecundação; (2) que as frequências alélicas do pólen são idênticas para todos os genótipos maternos; (3) que a taxa de cruzamento é independente do genótipo materno; e (4) que não existe seleção atuando nos marcadores entre a fase dos acasalamentos e a amostragem das progênes (Clegg, 1980).

Se a suposição da homogeneidade nas frequências gênicas do pólen é válida, o número de indivíduos heterozigotos esperado é o mesmo para cada família de genótipo materno homozigoto idêntico (Brown et al., 1987).

As características naturais das populações das plantas são muitas vezes inconsistentes com essas suposições, entretanto, são inicialmente testadas em situações naturais, e muitas vezes promovem valiosas informações dentro da biologia das espécies e sobre a organização genética das populações (Hamrick, 1989).

Ritland (1990) desenvolveu um programa de computador para estimativa da taxa de cruzamento baseado no modelo de acasalamento misto. O programa é denominado de “multilocos t” e permite estimar: 1) a taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m);

2) a taxa de cruzamento uniloco (\hat{t}_s), obtida pela média aritmética da taxa de cruzamento dos locos; 3) o coeficiente de endogamia do genótipo materno (\hat{f}), e; 4) a frequência gênica do pólen (p) e dos óvulos (t). As diferenças positivas entre $\hat{t}_m - \hat{t}_s$, indicam endogamia biparental. O programa pode também computar estimativas de t e p para cada família e a probabilidade de que cada progênie seja autofecundada.

Para as estimativas multilocos é necessário assumir que: 1) os marcadores utilizados são seletivamente neutros e de segregação gênica independentemente; 2) parentes maternos têm a mesma \hat{t}_m , e; 3) a frequência gênica do pólen é homogênea para todos os genótipos maternos. Assim, \hat{t}_m é uma estimativa efetiva de cruzamento, devido a medir primariamente a endogamia atribuída a uma variedade de fatores, em adição à autofecundação (Clegg, 1980; Ritland & Jain, 1981; Ritland, 1983).

Um ponto importante a ser considerado, quando da estimativa da taxa de cruzamento, é que a existência de acasalamentos entre aparentados (acasalamentos endogâmicos), podem, muitas vezes, contribuir expressivamente para os níveis de endogamia em populações naturais. Considerando que o modelo de acasalamento misto de Ritland & Jain (1981), não discrimina entre a taxa de autofecundação efetiva da endogamia, devido aos acasalamentos endogâmicos, a existência de tal forma de reprodução resultará em estimativa tendenciosa da autofecundação efetiva (Ritland, 1984). Outro ponto importante é que o modelo de acasalamento de Ritland não distingue entre sementes originadas de autofecundação (que, no caso de espécies dióicas, só ocorre através do cruzamento entre aparentados) das originadas a partir da apomixia (Murawski et al. 1990; Murawski & Hamrick, 1992b; Murawski et al., 1994), portanto, caso existam evidências desta forma de reprodução nas populações em estudo, é importante acessar a informação através de uma metodologia estatística específica.

As taxas de cruzamento multilocos e uniloco têm sido estimadas para espécies arbóreas tropicais por inúmeros pesquisadores, destacando-se os trabalhos de O'Malley & Bawa (1987) para *Pithecellobium pedicelare*, Murawski et al. (1990) para *Cavanillesia platanifolia* e *Quararibea asterolepis*, Eguiarte et al. (1992) para *Astrocaryum mexicanum*, Murawski & Hamrick (1992b) para *Ceiba pentandra*, Perez-Nasser et al. (1993) para *Psychotria faxlucens*, Escalante et al. (1994) para *Phaseolus*

coccineus e *P. vulgaris*, Murawski et al. (1994) para *Shorea congestiflora* e *S. trapezifolia*, Gandara (1996) para *Cedrela fissilis*, Reis (1996) para *Euterpe edulis* e Lepsch-Cunha (1996) para *Curatari multiflora*.

No sistema de reprodução sexual predomina a polinização cruzada, característica da maior parte das espécies arbóreas (Spurr & Barnes, 1984). Bawa (1974), estudando o sistema de acasalamento em espécies arbóreas tropicais na floresta tropical semidecídua da Costa Rica, através de polinização controlada e observações da biologia floral, encontrou que, de 130 espécies 14% eram auto-compatíveis, 54% auto-incompatíveis, 68% hermafroditas, 22% dióicas e 10% monóicas. Os resultados mostraram claramente as estratégias adotadas pelas espécies para evitar a autofecundação e forçar o cruzamento, isto é, forçar a recombinação genética, permitindo desse modo, a manutenção de variabilidade genética.

Em populações alógamas todas as plantas são altamente heterozigotas e, quase sem exceção, a endogamia forçada resulta em deterioração geral do vigor, bem como o aparecimento de outros efeitos adversos (Allard, 1971).

2.5. Apomixia

Segundo Raven et al. (1978), o termo “apomixia” vem do grego *apo*, separar, afastar, + *mixis*, ato de unir, portanto, reprodução sem meiose ou singamia, sendo também sinônimo de reprodução assexuada ou vegetativa; atualmente, porém, o termo apomixia ou agamosperma perdeu esta significação.

Apomixia é a reprodução partenogênica na qual um indivíduo é gerado a partir de um ovo não fertilizado ou de uma célula somática, sem contribuição genética paterna (Futuyma, 1992), o que resulta em um indivíduo geneticamente idêntico ao organismo materno (Raven et al., 1978). Allard (1971) por sua vez, define apomixia como a reprodução em que tomam parte órgãos sexuais ou estruturas relacionadas, contudo não ocorrendo a fertilização, de forma que as sementes resultantes são produzidos vegetativamente. No entanto, já segundo Murawski (1995), apomíticos pseudogamos requerem a fertilização do endosperma para o desenvolvimento das sementes.

A apomixia facultativa é o meio que, de um lado, permite a produção maciça de sementes de genótipos semelhantes e, de outro, preserva um estoque de variabilidade potencial que, mais tarde, pode ser liberado através da produção ocasional de sementes sexuadas (Swanson et al., 1969). Pode ainda, garantir a perpetuação de qualquer linhagem que mostre adaptação ecológica.

Segundo Write (1977), em quase todas as espécies de reprodução sexuada os óvulos parecem possuir uma capacidade rudimentar para a reprodução apomítica, que pode se manifestar em raras ocasiões, caso não sejam fertilizados, porém, o autor acrescenta que a apomixia em espécies vegetais ocorre muito esporadicamente, sendo freqüente nas gramíneas e nas compostas, mas rara ou mesmo desconhecida nas gimnospermas, nas orquídeas e nas leguminosas.

Segundo Moraes (1993), a reprodução apomítica aumenta a endogamia na população. Entretanto, isso só ocorre, se apenas os indivíduos endogâmicos estiverem se reproduzindo apomiticamente, porque a apomixia não leva necessariamente à endogamia, já que ela reproduz o genótipo idêntico à sua matriz. A reprodução apomítica de um indivíduo endogâmico pode ser contrabalanceada pelo mesmo tipo de reprodução em um indivíduo não endogâmico, mantendo constante a variabilidade genética na população.

A apomixia é responsável pela expansão de diversas famílias e gêneros de espécies, muitos dos quais são perenes e encontrados em *habitats* com distúrbios (Asker & Jerling¹, citados por Murawski, 1995). Plantas de tais ambientes são reduzidas em pequenos tamanhos populacionais devido a eventos estocásticos como: efeito fundador, deriva genética e depressão endogâmica (Murawski, 1995). Além disso, segundo a autora, a redução da população pode favorecer a depressão endogâmica e o aparecimento de apomixia, sendo que, nesse caso, a agamospermia parece ser uma estratégia populacional para manutenção da variabilidade genética existente. Ela aumenta a proporção dos genótipos já existentes, ou seja, a apomixia facultativa pode conter o efeito da depressão endogâmica e deriva genética através do prolongamento e aumento do número de genótipos e, conseqüentemente, conservar a heterozigosidade advinda da reprodução sexuada (Gustafsson², citado por Murawski, 1995). Marshall & Brown (1981) afirmam

1. ASKER, S.E. & JERLING, L. "Apomixis in Plant". CRC Press, Ann. Arbor. 1992.

2. GUSTAFSSON, A. Apomixis in Higher Plants. I-III. Lunds Universitets Arsskrift, 42, 1-67; 43, 69-179; 183-370. 1946/1947.

que muitas espécies apomíticas são perenes e derivadas de antecessores de exocruzamento e Kaur et al. (1978) consideram que a apomixia pode ser mais generalizada em florestas tropicais do que se imagina.

Segundo Murawski et al. (1990), a eletroforese de isoenzimas é uma ferramenta de alto potencial para documentar a extensão da reprodução apomítica. No entanto, os estudos têm falhado na tentativa de detectar tal forma de reprodução em espécies arbóreas tropicais. Duas espécies arbóreas da floresta Dipterocarpaceae de Sri Lanka, estudadas a partir da análise isoenzimática, *Shorea* (Murawski et al., 1994) e *Stemonoporus* (Murawski & Bawa, 1994), foram altamente cruzadas, mas mostraram evidências de apomixia em indivíduos femininos, porém o teste estatístico para detectar tal forma de propagação a partir de isoenzimas não evidenciou tal fato. Murawski et al. (1990) testaram a presença de apomixia a partir de marcadores isoenzimáticos em *Cavanillesia platanifolia*, entretanto, a hipótese da presença de tal forma de reprodução também foi rejeitada.

Crestana (1993), estudando duas áreas amostrais em uma população de *G. americana* (dióica), na mata ciliar do Rio Mojiguaçu, emasculou flores masculinas (pela retirada dos estames do androceu) e femininas (pela retirada do estigma do gineceu) e observou que as flores masculinas não produziram frutos, contudo, 60% das flores femininas produziram frutos apomíticos, concluindo que em flores deste sexo não visitadas pelos polinizadores ocorre a produção de sementes apomíticas.

Em espécies dióicas a existência de apomixia aumenta a proporção de indivíduos femininos na população, o que provavelmente é estratégia para equiparar a proporção entre sexos de 1:1 (Murawski, 1995).

Segundo Spurr & Barnes (1984), a maior parte das espécies lenhosas tem alguma forma de reprodução assexual ou apomítica, o que dá ao indivíduo a capacidade de adaptação imediata ao ambiente e é um dispositivo que promove uniformidade na população.

2.6. Distribuição Espacial dos Genótipos

O conhecimento da estrutura genética, dentro das populações, é de suma importância para os geneticistas florestais (Perry & Knowles, 1991), visto que os padrões espaciais da estrutura genética intra-populacional são componentes fundamentais dos processos evolucionários e ecológicos em populações naturais de plantas (Brown, 1979). A estruturação genética afeta, inclusive, os estudos empíricos sobre genética de populações e são importantes para se determinar a intensidade ideal de amostragem, dentro das populações, para fins de conservação genética ou de cruzamentos (Epperson, 1990; Gandara, 1996).

A maioria dos estudos realizados com populações de espécies arbóreas tropicais, a partir de marcadores isoenzimáticos, tem revelado alta variabilidade genética, sendo que a maior parte desta, se encontra dentro das populações. Hamrick & Godt (1990) observaram que, em média, 78% da variabilidade genética total se concentra dentro das populações de plantas e 82% dentro das populações de espécies arbóreas tropicais. Acredita-se que essa distribuição da variabilidade genética provavelmente não é aleatória, dada a limitada dispersão de pólen e sementes, bem como a seleção para micro *habitats* (Loveless & Hamrick, 1984).

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

Nas de espécies dióicas, a existência de acasalamentos entre aparentados é a única forma de ocorrência de endogamia nas populações. Apesar da endogamia gerada em um ciclo de acasalamentos ser efetivamente mais fraca que a autofecundação

completa, esta pode levar às mesmas conseqüências genéticas indesejáveis em poucas gerações de acasalamentos consangüíneos.

Inúmeros métodos têm sido desenvolvidos e utilizados para detecção de estrutura espacial dentro de populações, dentre os quais, muitos envolvem dados de isoenzimas. Alguns autores têm-se utilizado da estatística \hat{F}_{ST} (Wright, 1965) e \hat{G}_{ST} (Nei, 1973, 1987), contudo, Dewey & Heywood (1988) chamam a atenção para as desvantagens na caracterização da estruturação através de tais abordagens, que seriam não detectar estruturação em uma escala menor que as dimensões das subpopulações e, em adição, se o verdadeiro limite da subpopulação está contido dentro das subpopulações experimentais, a variância na frequência gênica na escala espacial escolhida poderá ser subestimada.

Loiselle et al. (1995) usaram o coeficiente de coancestralidade ($\hat{\theta}$) de Cockerham (1969) para caracterizar a estruturação em *Psychotria officinalis*. Porém, como $\hat{\theta}$ é um parâmetro de divergência similar à \hat{F}_{ST} e \hat{G}_{ST} , as restrições para a utilização são as mesmas que as discutidas anteriormente.

Atualmente, a abordagem estatística, através da autocorrelação espacial de Sokal & Oden (1978), tem ganho popularidade nos estudos de estruturação dentro de populações (Perry & Knowles, 1991). Essa estatística permite detectar-se em qual escala espacial ocorre a diferenciação genética na população (Sokal & Oden, 1978), testando a independência de uma variável observada em um determinado local, relativamente às variáveis localizadas próximas a ela.

A autocorrelação espacial é caracterizada pelo índice I de Moran, que quantifica a similaridade genética entre pares de indivíduos espacialmente adjacentes, concernente à amostra da população como um todo. Os valores de I podem variar de +1 (autocorrelação completa positiva, isto é, indivíduos pareados têm valores idênticos) a -1 (autocorrelação completa negativa). De acordo com Sokal & Oden (1978), sob hipótese de nulidade de estruturação espacial, I é assintoticamente gauseano, com valores esperados próximos a zero e mais, os testes de significância para I são obtidos pela conversão dos valores de I em desvios padrões normais (Sokal & Oden, 1978).

O índice I de Moran pode ser estimado para várias metodologias estatísticas. Para espécies arbóreas, Dewey & Heywood (1988) e Gandara (1996)

estimaram o índice I de Moran para a conexão de Gabriel, vizinho mais próximo e por classes de distâncias. Perry & Knowles (1991), por sua vez, estimaram o índice I apenas por classes de distâncias.

O I para conexão de Gabriel compara dois indivíduos, A e B, caso nem um outro indivíduo se encontre sobre ou dentro do círculo formado pelo diâmetro da linha AB (Sokal & Oden, 1978). Esse processo resulta em muitos indivíduos sendo pareados com vários outros indivíduos próximos. Como os indivíduos pareados são conectados por um segmento de linha sob o mapa da população, é gerada uma rede contínua. O I para o vizinho mais próximo compara cada indivíduo apenas com a planta vizinha amostrada, geralmente resultando em muitos grupos desconectados de indivíduos. O I da conexão de Gabriel tem a vantagem de gerar um grande número de pares de indivíduos, isto é, um tamanho amostral grande, para o cálculo de I, enquanto o vizinho mais próximo tem a vantagem de gerar um conjunto de pares de indivíduos em uma média pequena de distância entre plantas (Dewey & Heywood, 1988).

Muitos pesquisadores, intuitivamente, suspeitam da existência de estruturação dentro das populações naturais de plantas, porém, a maioria dos estudos rejeitou esta hipótese, mostrando uma distribuição aleatória dos genótipos. Dentre os quais podemos citar os trabalhos realizados em populações naturais, por Dewey & Heywood (1988) com *Psychotria nervosa*, Schnabel & Hamrick (1990) com *Gleditsia triacanthos*, Tokunaga & Ohnishi (1992) com *Raphanus sativus* L. var. *hortensis* Backer f. *raphanistroides* M. e Gandara (1996) com *Cedrela fissilis*. Entretanto, Perry & Knowles (1991), estudando populações de *Acer saccharum* Marsh, encontraram uma moderada estruturação, e assim, atribuíram a não aleatoriedade dos genótipos ao fluxo gênico restrito, seleção e/ou estabelecimento desigual dos grupos geneticamente distintas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Caracterização do Local de Estudo

O estudo foi realizado em floresta mesófila semidecídua de planalto, em duas subpopulações (SPop's) naturais de *G. americana*, localizadas em mata ciliar do Rio Mojiguaçu, pertencente à Estação Ecológica de Mojiguaçu, Fazenda "Campininha", da Estação Experimental de Mojiguaçu, do Instituto Florestal de São Paulo. A mata situa-se nas 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 Mojiguaçu, sendo mata ciliar remanescente da Bacia Hidrográfica Mogiana, 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*.

3.1.2. Tamanho da Amostra

Como a *G. americana* é dióica e a sua distribuição espacial na área, não é contínua, apresentando dois agrupamentos isolados por mais ou menos 130 metros, procedeu-se à coleta das amostras foliares das plantas adultas femininas e masculinas e sementes em algumas das plantas femininas, em frutificação no período de amostragem, como subdividida em duas SPop's (Figura 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 densidade de amostragem é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. 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*. Piracicaba-SP, ESALQ/USP. 1997.

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

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Coleta e Transporte das Amostras

À coleta das amostras para análise de eletroforese procedeu-se da seguinte forma: após vistoria da distribuição espacial dos indivíduos de *G. americana*, dentro das duas SPop's, se marcou e coletou sementes de 5 plantas femininas na SPop1 e 10 na SPop2. As sementes foram embaladas em sacos de papel, devidamente identificados por família, e colocadas para germinar separadamente por lote, em caixas plásticas, no viveiro do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. Quando as plântulas atingiram

de 5 a 7 centímetros de altura, procedeu-se à repicagem de 30 indivíduos por família, em laminado plástico. As mudas foram mantidas cobertas com sombrite a 50 %, durante um mês, sendo em seguida expostas diretamente à luz solar. Para a amostragem dos adultos, marcou-se 10 plantas a mais na SPop1 e 17 na SPop2. Coletou-se folhas em todas as plantas adultas marcadas no campo (ver Tabela 3), que foram embaladas em sacos plásticos identificados com o número da árvore de origem, acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP e então armazenadas em geladeira a 5^o Celcius.

3.2.2. Amostras para Eletroforese de Isoenzimas

A eletroforese de isoenzimas para caracterização genética da espécie foi realizada no LARGEA, segundo a metodologia proposta por Kephart (1990) e Alfenas et al. (1991). Para essa caracterização utilizou-se tecidos foliares de plântulas de progênies com 8 a 10 meses de idade e de indivíduos adultos. A colheita dos tecidos foliares das plântulas era feita preferencialmente no período da manhã e imediatamente submetidas à maceração (devido à perda muito rápida da atividade enzimática do material), posteriormente embaladas em endorfes e armazenadas em freezer a - 5^o Celcius. À noite, no mesmo dia, as amostras das progênies eram submetidas à eletroforese. Já o tecido foliar dos indivíduos adultos era macerado imediatamente à coleta de campo e submetido à eletroforese.

3.2.3. Extração das Enzimas

A rotina de extração das enzimas empregava aproximadamente 20mg de tecido de limbo foliar, macerado com auxílio de um bastão de vidro em placas de porcelana, sobre barras de gelo, com adição de aproximadamente 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 (Tabela 4). A solução, extraída individualmete para

cada planta (adultos e progênies), contendo o material genético (enzimas) era absorvida em pedaços de papel de filtro (Whatman nº 3), nas dimensões de 6 x 10mm (*Wicks*), e, posteriormente, submetida ao processo de eletroforese. Cada gel acondicionava amostras de 20 indivíduos, sendo, nas duas extremidades, adicionados wicks embebidos em solução de azul de bromofenol a 0,1%, objetivando marcar a distância máxima possível de migração das isoenzimas durante a “corrida”.

3.2.4. Procedimentos de Eletroforese

A eletroforese de isoenzimas foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%. As “corridas” foram realizadas em geladeira, com temperatura de 5° Celsius. Sobre os géis eram adicionadas placas de vidro e cubas de gelo, visando reduzir o aquecimento causado pelo atrito no processo de migração das enzimas. Nos primeiros 30 minutos de “corrida”, mantinha-se a corrente elétrica constante a 35mA, sendo, posteriormente, elevado a 40mA até o final do processo. A voltagem nos eletrodos foi de 120 a 180 volts e no gel, de 6 a 8 volts nos primeiros 30 minutos, e 140 a 210 volts e 8 a 10 volts, nos eletrodos e no gel, respectivamente, no restante do tempo de “corrida”. Os *wicks*, contendo as amostras, eram retirados dos géis, após 30 minutos de migração, sendo que o tempo médio do processo de “corrida” era de aproximadamente 8:30 horas. Neste ponto, o marcador de azul de bromofenol atingia de 7 a 8cm de migração. Terminadas as “corridas”, os géis eram cortados em 7 fatias, com espessura em torno de 1,0mm, conforme Alfenas et al. (1991, pag. 116), sendo a primeira e as duas últimas fatias descartadas. As quatro faces restantes eram submetidas à coloração em enzimas específicas. Os sistemas isoenzimáticos PGM, PGI, 6PGDH e β -EST foram coloridos sempre nas fatias mais nobres (as 2 primeiras).

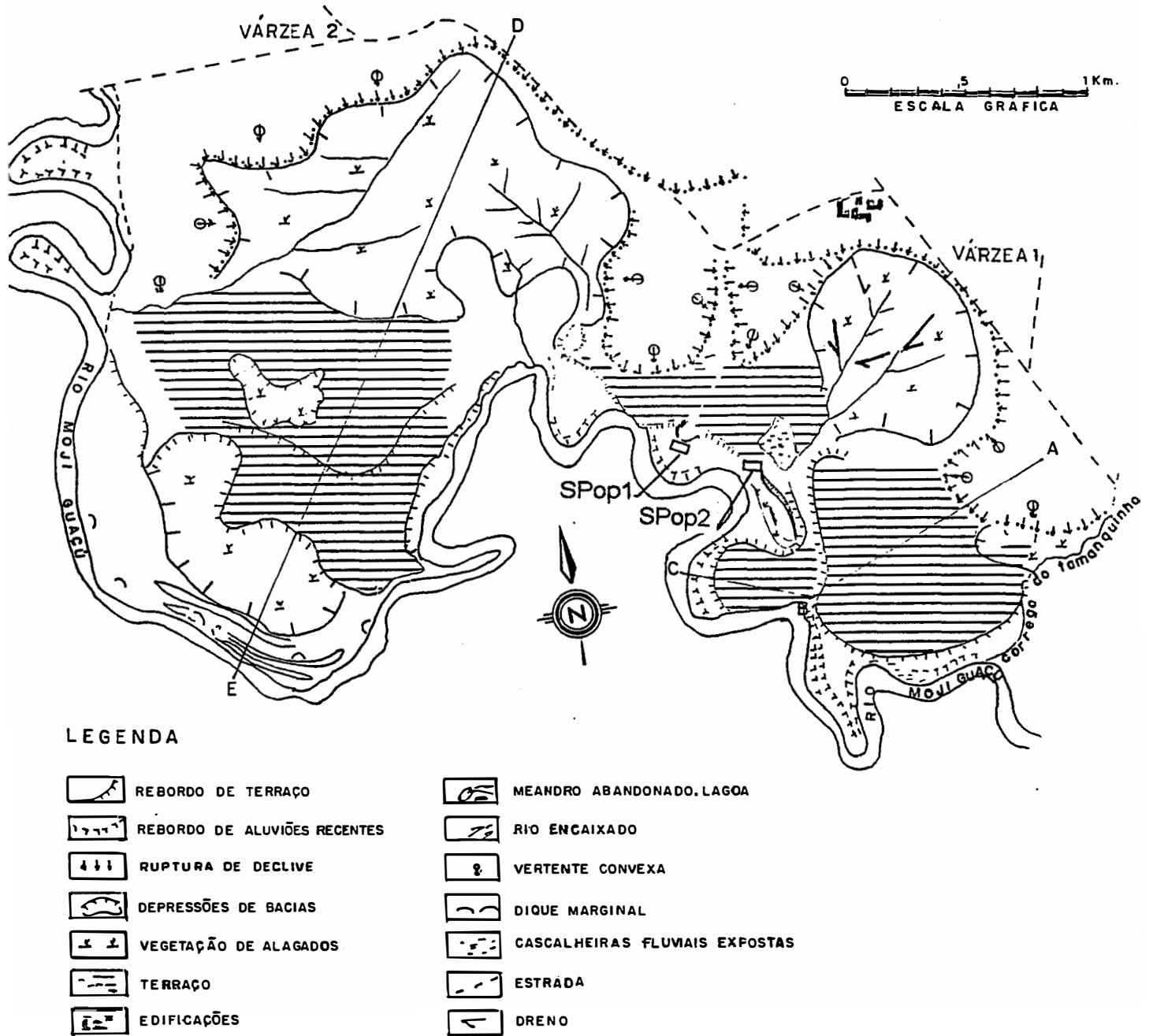


Figura 1. Esboço geomorfológico da várzea da Fazenda Campininha - Conchal, SP.

Fonte: Perez Filho et al. (1980).

Tabela 4. Solução de extração utilizada em *G. americana*, modificada de Alfenas et al. (1991), pela ausência de 2-Mercaptoetanol. Piaracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Composição	quantidade
Fosfato de sódio bibásico (0,034M)	0,30g
Sacarose (0,2M)	3,50g
PVP-40 (2,56%)	1,27g
DTT (3mM)	25mg
L-Ácido ascórbico (5,7mM)	50mg
DIECA (5,8mM)	50mg
Bissulfito de sódio (2,6mM)	25mg
Borato de sódio (Borax) (2,5mM)	25mg
Poliétilenoglicol-6000 (1%)	0,5g
Água destilada (q.s.p.)	50ml

3.2.5. Procedimento de Coloração dos Géis

Para obtenção dos sistemas enzimáticos SKDH, ACP, PGM, 6PGDH, PGI e MDH, diluía-se todos os reagentes (substratos, cofatores, catalisadores e outros) no tampão de coloração específico do sistema enzimático e em seguida essa solução era adicionada ao gel, acondicionado em cuba de porcelana e imediatamente incubado no escuro, em estufa a 37° Celsius, até o aparecimento das bandas (entre 20 a 40 minutos).

A β -EST era preparada em duas soluções, solução A e B. A solução A, obtida pela diluição do substrato em etanol a 50%, após o que adicionada a 40ml de tampão de coloração, em seguida, despejada sobre o gel e este, incubado no escuro em estufa a 37°. A solução B, obtida pela diluição do Fast Garnet GBC Salt em 40ml do tampão de coloração; posteriormente, adicionada ao gel imerso na solução A e incubada novamente na estufa, até o aparecimento das bandas (entre 10 a 20 minutos).

Para obtenção da peroxidase (PRX), diluía-se o substrato no tampão de coloração, adicionava-se ao gel e depois se pipetava 2ml de água oxigenada a 3%. As bandas apareciam em um intervalo de 1 a 2 minutos.

Posteriormente à revelação, os géis eram secados, fotografados e desenhados em sacos plásticos com o auxílio de canetas de retroprojektor. Nos desenhos procurava-se manter a intensidade e dimensões originais das isoenzimas. Era também registrada, a origem da migração, o fronte da migração do azul de bromofenol, além de dados de identificação, como: número da família, sistema enzimático e data da coloração. Alguns géis foram interpretados seguidamente a revelação das isoenzimas, que, sem

dúvida, é a melhor forma de obtenção dos resultados, visto que a interpretação direta dos zimogramas é menos sujeita a erros.

A distância do marcador de bromofenol era medida no momento em que os géis eram cortados, a fim de obter-se, como colocam Alfenas et al. (1991), os valores de $R_f = d_i/d_b$ (onde: d_i = distância da origem à isoenzima correspondente; d_b = distância da origem de migração ao frente do marcador de bromofenol).

A estimativa da migração relativa (R_M) foi realizada conforme Cheliak & Pitel (1984), $R_M = d_i/d_f$, onde: d_f = distância da origem até à posição da banda mais freqüente.

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.

Para numeração dos locos e alelos neste estudo, os sistemas enzimáticos com revelação de mais de um loco, denominaram-se alfa-numericamente, de forma crescente, dos locos mais catódicos para os mais anódicos. Para os alelos denominou-se o mais freqüente com valor um (1), e de forma crescente dos alelos mais catódicos para os mais anódicos, portanto, identificados pela sua migração relativa (R_f).

3.2.6. Determinação do Protocolo de *G. americana*

Para determinação do protocolo eletroforético de *G. americana* testou-se 23 sistemas enzimáticos, conforme a Tabela 5, em três sistemas de tampão eletrodo/gel, conforme a Tabela 6. Os sistemas enzimáticos testados, foram os mais comumente usados no LARGEA e citados em Alfenas, et al. (1991, p. 133 a 160). Dos sistemas que apresentaram atividade enzimática, escolheu-se os oito melhores, relativamente ao padrão de resolução, dentro de um mesmo tampão de eletrodo/gel, objetivando otimizar as rotinas de laboratório e os custos do material.

Após os testes preliminares, o protocolo determinado para *G. americana* utilizava o tampão de cuba e gel Tris Citrato (TC), nas concentrações apresentadas na Tabela 6, e os sistemas enzimáticos SKDH, PGM, ACP, β -EST, PGI, MDH, 6PGDH e PRX, conforme receitas na Tabela 7.

Tabela 5. Sistemas enzimáticos testados em *G. americana* L. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 1997.

Enzima	Código	Sigla
Álcool Desidrogenase	ADH-E.C. 1.1.1.1	ADH
Aldolase	ALD-E.C. 4.1.2.13	ALD
Alfa-Esterase	α -EST-E.C. 3.1.1.1	α -EST
Beta-Esterase	β -EST-E.C. 3.1.1.1	β -EST
Beta-Galactose Desidrogenase	GLDH-E.C. 1.1.1.48	GLDH
Catalase	CAT-E.C. 1.11.1.6	CAT
Fosfatase Ácida	ACP-E.C. 3.1.3.2.	ACP
Fosfoglucomutase	PGM-E.C. 2.7.5.1	PGM
6-Fosfocluconato Desidrogenase	6PGDH-E.C. 1.1.1.44	6PGDH
Fosfogluose Isomerase	PGI-E.C. 5.3.1.9	PGI
Glicerato-2 Desidrogenase	G2DH-E.C. 1.1.1.29	G2DH
Gliceroldeído-3-Fosfato Desidrogenase	G3PDH-E.C. 1.2.1.12	G3PGH
Glucose-6-Fosfato Desidrogenase	G6PDH-E.C. 1.1.1.49	G6PDH
Glucose Desidrogenase	GLUDH-E.C. 1.1.1.47	GLUDH
Glutamato Desidrogenase	GDH-E.C. 1.4.1.3	GDH
Glutamato-Oxalacetato Transaminase	GOT-E.C. 2.6.1.1	GOT
Isocitrato Desidrogenase	IDH-E.C. 1.1.1.42	IDH
Leucina Aminopeptidase	LAP-E.C. 3.4.11.1	LAP
Malato Desidrogenase	MDH-E.C. 1.1.1.37	MDH
Manitol Desidrogenase	MADH-E.C. 1.1.1.67	MADH
Peroxidase	PO-E.C. 1.11.1.7	PRX
Superóxido Dismutase	SOD-E.C. 1.15.1.1	SOD
Xiquimato Desidrogenase	SKDH-E.C. 1.1.1.25	SKDH

Tabela 6. Sistemas de tampão eletrodo/gel para eletroforese de isoenzimas, testados em *G. americana* L. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Sistema	Tampão eletrodo	Tampão gel	Referência
Citrato	Ácido Cítrico 7,68g/l	Diluição a 1:20 de tampão do	Cheliack & Pitell
Morfolina (CM)	Titular com Morfolina até pH 6,1	eletrodo	(1984)
Histidina (H)	Histidina 0,05M, pH 6,0	Tris/Ácido Cítrico pH 6,6	Paiva (1992)
Tris-Citrato (TC)	Tris 27g/l, Ácido Cítrico 18,00g/l, pH 7,5	Diluição a 3,5% do tampão do eletrodo	Alferas, et al. (1991)

Tabela 7. Sistemas enzimáticos utilizados para o estudo genético de *G. americana*. ESALQ/USP. 1997.

	SKDH	PGM	ACP	β -EST	6PGHD	PGI	MDH	PO
Tampão Tris-HCL 0,1 M, pH 8,0	—	—	—	—	50 ml	50 ml	—	—
Tampão Tris-HCL 0,1 M, pH 8,5	50 ml	50 ml	—	—	—	—	50 ml	—
Tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0	—	—	50 ml	—	—	—	—	50 ml
Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0	—	—	—	80 ml	—	—	—	—
Substrato	Acido xiquímico	Gilucose-1-fosfato	α -naftil fosfato de sódio	β -naftil acetato	Acido 6-fosfogluconico	Frutose-6-fosfato	DL-ácido málico	O-dionisidine:
Catalisador	80 mg	125 mg	50 mg	40 mg	20 mg	40 mg	0,5, pH 8,0	30 mg
Mgcl ₂ 0,1 M	—	1 ml	1 ml	—	1 ml	1 ml	—	—
Cofator	NADP ⁺ - 10 mg	NADP ⁺ - 10 mg	—	—	NADP ⁺ - 10 mg	NADP ⁺ - 10 mg	NAD - 10 mg	—
G-6-PDH	—	0,01 ml	—	—	—	0,01 ml	—	—
MTT	10 mg	10 mg	—	—	20 mg	10 mg	10 mg	—
PMS	1 mg	1 mg	—	—	2 mg	1 mg	1 mg	—
Outros	—	EDTA: 25 mg	Fast Garnet GBC salt: 50 mg	Fast Garnet GBC salt: 30 mg	—	—	—	H ₂ O ₂ (3%)

3.2.7. Análise Estatística

A interpretação dos zimogramas permitiu a obtenção dos genótipos de cada indivíduo estudado (adultos e plântulas), possibilitando estimar os vários parâmetros caracterizadores da variabilidade genética entre e dentro das SPop's, da taxa de cruzamento, da distribuição espacial dos genótipos, do fluxo gênico e do tamanho efetivo da população.

3.2.7.1. Variabilidade Genética

3.2.7.1.1. Frequências Alélicas

As frequências alélicas descrevem a variação para um loco e foram obtidas pela contagem direta do número de alelos por loco, dividido pelo número total de alelos no loco, como segue:

$$\hat{p}_{ij} = n_{ij}/n_{.j}$$

\hat{p}_{ij} = frequência do alelo i na subpopulação j;

n_{ij} = número de ocorrência do alelo i na subpopulação j;

$n_{.j}$ = número total de alelos amostrados na subpopulação j.

3.2.7.1.2. Índices de Diversidade Genética

A partir das frequências alélicas obteve-se os índices de diversidade genética para adultos e plântulas, 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}), estimativas obtidas a partir do programa BIOSYS-1, desenvolvido por Swofford & Selander (1989). O programa estima esses parâmetros da seguinte forma:

a) Heterozigosidade Média Observada (H_o)

A heterozigosidade observada para cada loco foi obtida pela expressão:

$$H_o = 1 - \sum P_{ii},$$

onde: P_{ii} = frequência dos genótipos homozigotos;

Para obter-se a heterozigosidade média observada somou-se os valores obtidos para cada loco e dividiu-se pelo número total de locos (monomórficos mais polimórficos).

b) Heterozigosidade Média Esperada (\hat{H}_e)

A heterozigosidade para cada loco foi obtida a partir das frequências alélicas, segundo expectativas de equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com Nei (1987):

$$\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2,$$

onde: p_i = frequência alélica estimada do i ésimo alelo.

A heterozigosidade média esperada foi obtida pela média aritmética entre todos os locos analisados (monomórficos mais polimórficos).

c) Porcentagem de Locos Polimórficos (P)

O P foi obtido pela média aritmética do número total de alelos pelo número de locos. Considerou-se como um loco polimórfico o loco em que a frequência do alelo mais comum não ultrapassasse 99%. Assim, a proporção mínima de heterozigotos que o loco pode apresentar é de 2%.

d) Número Médio de Alelos por Loco (A)

O número médio de alelos por loco foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número de total de locos.

e) Índice de Fixação de Wright (\hat{f})

Os índices de fixação foram estimados ao nível de locos e média entre locos, segundo Vencovsky (1993; 1994), pelas relações:

$$\hat{f} = 1 - \frac{H_o}{\hat{H}_e} \quad (1) \text{ (nível de loco); } \hat{f} = 1 - \frac{\sum H_o}{\sum \hat{H}_e} \quad (2) \text{ (média ponderada entre locos)}$$

Os índices permitem acessar os níveis de fixações alélicas por loco e ao nível de média de locos, informando sobre o grau de endogamia dentro das populações. O \hat{f} também pode ser usado para testar desvios das frequências genotípicas uniloco, das expectativas de Hardy-Weinberg (Murawski & Bawa, 1994), devido a nesse caso os acasalamentos ocorrerem de forma aleatória; portanto, em populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg não existe endogamia e o valor de \hat{f} é igual a zero

O teste para verificar se o valor de \hat{f} era estatisticamente diferente de zero, ao nível de loco, foi o $\chi^2 = N \hat{f}^2 (k-1)$, com GL = $[k(1-k)]/2$, onde: \hat{f} = índice de fixação, N = tamanho total da amostra e K número de alelos (Li & Horvitz, 1953). Para a média entre os locos usou-se o teste $z = (\hat{f} - 0) / \hat{\sigma}_{\hat{f}}$, onde: \hat{f} = média de \hat{f} entre os locos, $\hat{\sigma}_{\hat{f}}$ = 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). Caso $z \geq 1,96$ ou $2,58$, a média será diferente de zero, a um intervalo de confiança de 95 ou 99% de probabilidade, respectivamente.

3.2.7.1.3. Análise da Estrutura Genética das SPop's

A estrutura genética das subpopulações foi abordada a partir da análise de variância das freqüências alélicas (Cockerhan, 1969; Weir, 1990; Vencovsky, 1992), devido a esta apresentar menos viés, em vista disso, apresenta mais precisão do que a diversidade genética de Nei (1973) e as estatísticas F de Wright, visto que, esta considera o processo amostral nas estimativas (genes, indivíduos, famílias e subpopulações). A análise de variância fornece a distribuição da variabilidade genética nos vários níveis hierárquicos em que está estruturada a amostragem, os níveis de fixação alélica dentro e total das SPop's, o tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e) e informa sobre as melhores estratégias de amostragem.

Análise de Variância de Freqüências Alélicas

Em um primeiro momento analisou-se os dados considerando duas SPop's e, após, desconsiderando-se esta estrutura, tomando os dados como sendo de uma única população.

Esta análise foi inicialmente realizada ao nível de alelo e, posteriormente, conjunta para todos os alelos. Para cada alelo de cada loco polimórfico das plantas adultas e plântulas foi feita a análise de variância no modelo aleatório hierárquico desbalanceado, baseado em Weir (1990) e Vencovsky (1992). Assim, de acordo com estes autores, a variável x_{ik} corresponde ao gene "i" na população "i", portanto, quando x_{ik} estava presente recebeu o valor um, e quando estava ausente recebeu o valor zero.

a) Adultos Como Duas SPop's

Para análise das freqüências gênicas dos adultos como duas SPop's, o modelo matemático utilizado foi:

$$Y_{ik} = m + p_i + b_{k(i)} + g_{(ik)}$$

onde: Y_{ik} : freqüência do gene i, dentro do indivíduo k, dentro da SPopi;
m: média geral da freqüência alélica;

p_i : efeito da SPop $_i$, com $i = 1, 2, \dots, a$;

$b_{k(i)}$: efeito do indivíduo k , dentro da SPop $_i$, com $k = 1, 2, \dots, b_i$;

$g_{l(i,k)}$: efeito do gene l , dentro do indivíduo k , dentro da SPop $_i$, com $l = 1, 2, \dots, n_{i,k}$.

As estimativas dos componentes de variância para os adultos foram obtidas pela decomposição das esperanças dos quadrados médios da análise de variância, conforme Tabela 8, desse modo:

$$\hat{\sigma}_G^2 = QM_G$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = (QM_I - QM_G)/2$$

$$\hat{\sigma}_P^2 = (QM_P - QM_I)/K_1$$

onde: K_1 = corresponde ao coeficiente de variância entre SPop's ($\hat{\sigma}_P^2$), no modelo hierárquico desbalanceado.

Tabela 8: Esquema da análise de variância de frequências alélicas no modelo hierárquico desbalanceado para adultas de *G. americana* em duas SPop's. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

FV	GL	SQ	QM	$E(QM)^I$
SPop's	$a - 1$	SQ_P	QM_P	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2 + K_1\hat{\sigma}_P^2$
Indivíduos/SPop's	$\sum_{i=1}^a b_i - a$	SQ_I	QM_I	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2$
Genes/indivíduos/SPop's	$n.. - \sum_{i=1}^a b_i$	SQ_G	QM_G	$\hat{\sigma}_G^2$
Total	$n - 1$			

O significado genético dos componentes da variância são definidos abaixo:

$$\hat{\sigma}_P^2 = p(1-p)(\hat{\theta}_p)$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = p(1-p)(\hat{F} - \hat{\theta}_p)$$

$$\hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)(1 - \hat{F})$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_P^2 + \hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)$$

onde: p = frequência de um gene em um determinado loco;

$\hat{\theta}_p$ = distância genética média entre SPop's ou correlação das frequências alélicas entre plantas de diferentes SPop's;

\hat{F} = correlação entre alelos dentro de indivíduos de diferentes SPop's.

Do mesmo modo, as estimativas dos coeficientes de coancestralidade podem ser obtidas dos componentes da variância, da seguinte forma:

$$\hat{\theta}_p = \hat{\sigma}_p^2 / \hat{\sigma}_T^2$$

$$\hat{F} = 1 - (\hat{\sigma}_G^2 / \hat{\sigma}_T^2)$$

$$\hat{f} = (\hat{F} - \hat{\theta}_p) / (1 - \hat{\theta}_p) = \hat{\sigma}_I^2 / (\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2)$$

onde: \hat{f} = correlação entre alelos dentro de indivíduos de diferentes SPop's.

As estimativas médias dos valores de \hat{F} , \hat{f} e $\hat{\theta}_p$ foram obtidas pela soma dos quadrados médios individuais, dividida pela soma dos graus de liberdade:

$$QM_p = \sum SM_p / \sum GL_p$$

$$QM_I = \sum SM_I / \sum GL_I$$

$$QM_G = \sum SM_G / \sum GL_G$$

b) Adultos como Uma População

A análise das frequências gênicas dos adultos como uma população baseou-se no modelo matemático:

$$Y_{ik} = m + b_i + g_{k(i)}$$

onde: Y_{ik} : frequência do gene l , dentro do indivíduo k ;

m : média geral da frequência alélica;

b_i : efeito de indivíduos, com $i = 1, 2, \dots, a$;

$g_{k(i)}$: efeito do gene k , dentro do indivíduo i , com $k = 1, 2, \dots, b$;

As estimativas dos componentes de variância para os adultos foram obtidas pela decomposição das esperanças dos quadrados médios da análise de variância, conforme Tabela 9, desse modo:

$$\hat{\sigma}_G^2 = QM_G$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = (QM_I - QM_G) / 2$$

Tabela 9: Esquema da análise de variância de frequências alélicas no modelo hierárquico desbalanceado para adultos de *G. americana*, em uma população. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

FV	GL	SQ	QM	E(QM) ¹
Indivíduos	$\sum_{i=1}^a b_j - a$	SQ _I	QM _I	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2$
Genes/indivíduos	n. - $\sum_{i=1}^a b_j$	SQ _G	QM _G	$\hat{\sigma}_G^2$
Total	n - 1			

O significado genético dos componentes da variância são definidos abaixo:

$$\hat{\sigma}_I^2 = p(1-p)(\hat{f})$$

$$\hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)(1 - \hat{f})$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_I^2 / (\hat{\sigma}_T^2) = p(1-p)$$

onde: p = frequência de um gene em um determinado loco;

\hat{f} = correlação entre alelos dentro de indivíduos.

A estimativa do \hat{f} pode ser obtida dos componentes da variância, da seguinte forma:

$$\hat{f} = \hat{\sigma}_I^2 / (\hat{\sigma}_T^2) = \hat{\sigma}_I^2 / (\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2)$$

As estimativas médias dos valores de \hat{f} foram obtidas pela soma dos quadrados médios individuais, dividida pela soma dos graus de liberdade:

$$QM_I = \sum SM_I / \sum GL_I$$

$$QM_G = \sum SM_G / \sum GL_G$$

c) Plântulas Como Duas SPop's

Para análise de variância das frequências gênicas das plântulas, como duas SPop's, utilizou-se o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = m + p_i + f_{j(i)} + b_{k(ij)} + g_{(ijk)}$$

onde: Y_{ijk} : frequência do gene l, dentro do indivíduo k, dentro da família j, dentro da SPop_i;

m : média geral da frequência alélica;

p_i : efeito da SPop $_i$, com $i = 1, 2, \dots, a$;

$f_{j(i)}$: efeito da família j dentro da SPop $_i$, com $j = 1, 2, \dots, b_i$;

$b_{k(j)}$: efeito do indivíduo k , dentro da família j , dentro da SPop $_i$, com $k = 1, 2, \dots, c_{ij}$;

$g_{l(jk)}$: efeito do gene l , dentro do indivíduo k , dentro da família j , dentro da SPop $_i$, com $l = 1, 2, \dots, n_{ijk}$.

As estimativas dos componentes da variância para as plântulas foram obtidas da Tabela 10, a partir da decomposição das esperanças dos quadrados médios:

$$\hat{\sigma}_G^2 = QM_G$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = (QM_I - QM_G)/2$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = (QM_F - QM_I)/K_1$$

$$\hat{\sigma}_P^2 = [QM_P - (QM_I - K_2 \hat{\sigma}_F^2)]/K_3$$

onde: K_1 , K_2 e K_3 = correspondem aos coeficientes das variâncias entre famílias ($\hat{\sigma}_F^2$) e SPop's ($\hat{\sigma}_P^2$), no modelo hierárquico desbalanceado (ver Anexo 1).

Tabela 10: A análise da variância de frequências alélicas no modelo hierárquico desbalanceado para plântulas de *G. americana*, em mais de uma SPop's. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

FV	GL	SQ ¹	QM ¹	E(QM) ¹
SPop's	$a - 1$	SQ_P	QM_P	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2 + K_2\hat{\sigma}_F^2 + K_3\hat{\sigma}_P^2$
Famílias/SPop's	$\sum_{i=1}^a b_j - a$	SQ_F	QM_F	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2 + K_1\hat{\sigma}_F^2$
Indivíduos/Fam./SPop's	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} c_{ij} - \sum_{i=1}^a b_j$	SQ_I	QM_I	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2$
Genes/individ./Fam./SPop's	$n... - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} c_{ij}$	SQ_G	QM_G	$\hat{\sigma}_G^2$
Total	$n... - 1$			

1: Vide anexos para estimar os parâmetros.

O significado genético dos componentes da variância são definidos abaixo:

$$\hat{\sigma}_P^2 = p(1-p)(\hat{\theta}_P)$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = p(1-p)(\hat{\theta}_F - \hat{\theta}_P)$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = p(1-p)(\hat{F} - \hat{\theta}_F)$$

$$\hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)(1 - \hat{F})$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_P^2 + \hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)$$

onde: p = frequência de um gene em um determinado loco;

$\hat{\theta}_P$ = média da distância genética entre as SPop's ou correlação entre frequências alélicas das plantas de diferentes famílias dentro das SPop's;

$\hat{\theta}_F$ = coeficiente de parentesco ou coancestralidade das plantas dentro das famílias, ou correlação das frequências alélicas de diferentes plantas dentro das famílias;

\hat{F} = correlação entre alelos dentro de indivíduos de diferentes SPop's.

As estimativas dos coeficientes de coancestralidades podem ser obtidas dos componentes da variância por:

$$\hat{\theta}_P = \hat{\sigma}_P^2 / \hat{\sigma}_T^2$$

$$\hat{\theta}_F = (\hat{\sigma}_P^2 + \hat{\sigma}_F^2) / \hat{\sigma}_T^2$$

$$\hat{\theta}_F' = \hat{\sigma}_F^2 / (\hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2)$$

$$\hat{F} = 1 - (\hat{\sigma}_G^2 / \hat{\sigma}_T^2) = (\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_P^2) / \hat{\sigma}_T^2$$

$$\hat{f} = (\hat{F} - \hat{\theta}_P) / (1 - \hat{\theta}_P) = (\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_F^2) / (\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_G^2)$$

onde: $\hat{\theta}_F'$ = coeficiente de parentesco das plantas dentro das famílias ou correlação das frequências alélicas de diferentes plantas dentro das famílias; parâmetro que segundo Vencovsky (inf. pessoal) corresponde a 1/8 em famílias de meios irmãos, 1/4 em irmão germanos e 1 em atogamas. Valores desta estimativa, superiores a 0,125, indicam a presença de endogamia dentro das famílias. Este parâmetro é de grande valor em trabalhos de melhoramento, visto que $\hat{\sigma}_P^2 = 2\hat{\theta}_F\hat{\sigma}_A^2$; portanto, auxiliando na estimativa da variância genética entre famílias (Vencovsky, inf. pessoal).

\hat{f} = correlação entre alelos dentro de indivíduos, dentro de diferentes SPop's.

As estimativas médias entre locos para os parâmetros $\hat{\theta}_P$, $\hat{\theta}_F$, \hat{F} , \hat{f} e $\hat{\theta}_F'$, foram obtidas pela média ponderada dos quadrados médios, da seguinte forma:

$$QM_P = \sum SQ_P / \sum GL_P$$

$$QM_F = \sum SQ_F / \sum GL_F$$

$$QM_I = \sum SQ_I / \sum GL_I$$

$$QM_G = \sum SQ_G / \sum GL_G$$

d) Plântulas Como Uma População

A análise de variância das frequências gênicas das plântulas como uma população foi baseada no modelo matemático:

$$Y_{ijk} = m + f_i + b_{j(i)} + g_{k(ij)}$$

onde:

Y_{ijk} : frequência do gene k, dentro do indivíduo j, dentro da família i;

m: média geral da frequência alélica;

f_i : efeito da família i, com $i = 1, 2, \dots, a$;

$b_{j(i)}$: efeito do indivíduo j, dentro da família i, com $j = 1, 2, \dots, b_i$;

$g_{k(ij)}$: efeito do gene k, dentro do indivíduo j, dentro da família i, com $k = 1, 2, \dots, n_{ij}$.

As estimativas dos componentes da variância para as plântulas foram obtidas da Tabela 11, a partir da decomposição das esperanças dos quadrados médios:

$$\hat{\sigma}_G^2 = QM_G$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = (QM_I - QM_G) / 2$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = (QM_F - QM_I) / K_1$$

onde:

K_1 = correspondem ao coeficiente das variância entre famílias ($\hat{\sigma}_F^2$) no modelo hierárquico desbalanceado.

Tabela 11: Esquema da análise da variância de freqüências alélicas no modelo hierárquico desbalanceado para as plântulas das famílias de *G. americana*, em uma população. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

FV	GL	SQ	QM	E(QM) ¹
Famílias	$\sum_{i=1}^a b_j - a$	SQ _F	QM _F	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2 + K_1 \hat{\sigma}_F^2$
Indivíduos/Famílias	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} c_{ij} - \sum_{i=1}^a b_j$	SQ _I	QM _I	$\hat{\sigma}_G^2 + 2\hat{\sigma}_I^2$
Genes/indivíduos/Fam	$n... - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} c_{ij}$	SQ _G	QM _G	$\hat{\sigma}_G^2$
Total	$n... - 1$			

O significado genético dos componetes da variância são definidos abaixo:

$$\hat{\sigma}_F^2 = p(1-p)(\hat{\theta}_F)$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = p(1-p)(\hat{f} - \hat{\theta}_F)$$

$$\hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)(1 - \hat{f})$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2 = p(1-p)$$

onde: p = freqüência de um gene em um determinado loco;

$\hat{\theta}_F$ = coeficiente de parentesco ou coancestralidade das plantas dentro das famílias, ou correlação das freqüências alélicas de diferentes plantas dentro das famílias;

\hat{f} = correlação entre alelos dentro de indivíduos.

As estimativas dos coeficientes de coancestralidades podem ser obtidas dos componetes da variância por:

$$\hat{\theta}_F = \hat{\sigma}_F^2 / \hat{\sigma}_T^2$$

$$\hat{\theta}_F' = \hat{\sigma}_F^2 / (\hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_G^2)$$

$$\hat{f} = 1 - (\hat{\sigma}_G^2 / \hat{\sigma}_T^2) = (\hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_I^2) / \hat{\sigma}_T^2$$

onde:

$\hat{\theta}_F'$ = coeficiente de parentesco das plantas dentro das famílias ou correlação das freqüências alélicas de diferentes plantas dentro das famílias. O significado deste parâmetro é o mesmo definido anteriormente.

\hat{f} = correlação entre alelos dentro de indivíduos, dentro de diferentes famílias.

As estimativas médias entre locos para os parâmetros $\hat{\theta}_F$, $\hat{\theta}_F'$ e \hat{f} , foram obtidas pela média ponderada dos quadrados médios, da seguinte forma:

$$QM_F = \sum SQ_F / \sum GL_F$$

$$QM_I = \sum SQ_I / \sum GL_I$$

$$QM_G = \sum SQ_G / \sum GL_G$$

As análises de variâncias, descritas acima, foram obtidas a partir do procedimento VARCOMP, do programa estatístico SAS (SAS Institute, 1985).

3.2.7.2. Sistema Reprodutivo

O sistema reprodutivo foi abordado inicialmente pelo teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população porque pressupõe que os acasalamentos ocorrem de forma aleatória. Posteriormente, estimaram-se a taxa de cruzamento aparente, unilocos e multilocos. Devido a evidências de apomixia na população (Crestana, 1993) procurou-se detectar a existência desta, a partir de isoenzimas. Com o intuito de testar a adequação dos dados ao modelo multilocos, compararam-se as frequências alélicas dos óvulos e do pólen, óvulos e indivíduos adultos femininos e entre as famílias, verificando se o pólen fornecido para a formação das plântulas foi homogêneo nos cruzamentos.

a) Aderência dos Dados ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Endogamia de Wright

A aderência dos dados da população ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada a partir do programa BIOSYS-1 de Swofford & Selander (1989).

O teste utilizado foi o qui-quadrado (χ^2) não agrupado, porém, quando os valores das frequências genotípicas esperadas se apresentavam menores do que 1,00, eram agrupados em classes como: homozigotos para os alelos mais comuns, heterozigotos comuns/raros e homozigotos raros e outros heterozigotos, e testados pelo χ^2 agrupado e exato de Fischer. Conforme Gomes (1990), nos casos em que temos valores esperados

abaixo de 1,0, e muitos abaixo de 5,0, tal metodologia é a mais apropriada, permitindo assim, a confiabilidade do teste.

Quando os locos não se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, eram submetidos ao teste de equilíbrio de endogamia de Wright.

O teste de χ^2 para verificar a aderência dos genótipos observados aos genótipos esperados, segundo equilíbrio de endogamia de Wright, foi estimado conforme Vencovsky (1994).

$$\chi^2 = \sum (n_o - n_e)^2 / n_e$$

onde: n_o = frequência genotípica observada,

n_e = frequência genotípica esperada segundo equilíbrio de endogamia de Wright.

Esse teste considera o índice de fixação de Wright para as estimativas das frequências genotípicas esperadas de indivíduos homocigotos e heterocigotos. As frequências genotípicas esperadas foram obtidas segundo Weir (1990):

$$P_{ii} = p_i^2 + \hat{f} p_i (1 - p_i)$$

$$P_{ij} = 2p_i p_j (1 - \hat{f})$$

onde:

P_{ii} = frequência genotípica esperada de homocigotos;

P_{ij} = frequência genotípica esperada de heterocigotos;

\hat{f} = índice de fixação de Wright;

p_i = frequência do i ésimo alelo.

Os graus de liberdade foram dados por: $GL = [(n^\circ \text{ de genótipos} - 1) - (n^\circ \text{ de alelos} - 1) - 1]$, sendo um grau de liberdade perdido devido ao \hat{f} (Vencovsky, 1994). Como pode ser observado, devido à computação dos graus de liberdade, o teste só pode ser aplicado em locos que possuam no mínimo 3 alelos.

b) Taxa de Cruzamento

A taxa de cruzamento foi caracterizada apenas para a população, a partir da taxa de cruzamento aparente, obtida a partir do método dos momentos (Vencovsky, 1994), e a partir da taxa de cruzamento unilocos e multilocos, através de estimativas de máxima verossimilhança (Ritland & Jain, 1981; Ritland & El-Kassaby, 1985).

b1) Taxa de Cruzamento Aparente (\hat{i}_a)

A taxa de cruzamento aparente foi obtida a partir do índice de fixação de Wright, segundo metodologia proposta por Weir (1990) e Vencovsky (1994). O \hat{f} foi estimado para a população, conforme expressão (2) apresentada no item 3.2.7.1.7. e, posteriormente, a taxa de cruzamento pela expressão:

$$\hat{i}_a = (1 - \hat{f}) / (1 + \hat{f})$$

b2) Taxa de Cruzamento Unilocos (\hat{i}_s) e Multilocos (\hat{i}_m)

A taxa de cruzamento unilocos e multilocos foi obtida para a população a partir do programa MLT (“Multilocos”) de Ritland (1990), baseado no modelo de acasalamento misto de Clegg (1980) e Ritland & 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 & Jain, 1981; Ritland, 1990; Murawsky et al., 1994).

O programa permite estimar \hat{i}_s e \hat{i}_m para a população e para as famílias através do método Newton-Raphson e as frequências alélicas do óvulo e do pólen, pelo método de máxima verossimilhança. Para estimar o erro padrão das estimativas de cruzamento unilocos e multilocos, para a população, o programa utilizou o método

“bootstrap”, onde a unidade de amostragem são as plantas dentro das famílias. Utilizou-se 1000 reamostragens dentro das famílias, com base em Murawski et al. (1994).

De acordo com El-Kassaby & Ritland (1987), o programa MLT testa a aderência dos locos ao modelo de acasalamento misto, pelo teste de χ^2 , entre os desvios das frequências genóticas observadas relativamente ao esperado pelo modelo.

Para a obtenção das estimativa de \hat{i}_s , submeteu-se, separadamente, loco a loco ao programa MLT. Em seguida, estimou-se a taxa de cruzamento média uniloco, pela média aritmética da taxa de cruzamento obtida para cada loco, bem como seu respectivo erro padrão ($\hat{\sigma}_{\hat{i}_s} = \sqrt{\hat{\sigma}_{i_s}^2 / n}$); onde: $\hat{\sigma}_{\hat{i}_s}$ = erro padrão da taxa de cruzamento uniloco média; $\hat{\sigma}_{i_s}^2$ = variância das taxas de cruzamento uniloco; n = número de taxas de cruzamentos uniloco). Para a estimativa de \hat{i}_m submeteu-se todos os locos, ao mesmo tempo, ao programa MLT. Essas estimativas são muito importantes porque permitem verificar a existência de acasalamentos entre indivíduos aparentados. Segundo Shaw & Allard (1982), Ritland & El-Kassaby (1985) e Ritland (1990), a diferença positivas entre a taxa multilocos e unilocos ($\hat{i}_m - \hat{i}_s$) decorre da existência de acasalamentos entre indivíduos aparentados na população. A diferença entre \hat{i}_m e 1,0 permite obter a proporção de autofecundação - \hat{s} - (Ritland, 1990). Entretanto, de acordo com Murawski & Hamrick (1992b) e Murawski et al. (1994), o modelo de acasalamento misto de Ritland & Jain (1981) não distingue autofecundação de apomixia, levando, no caso de espécies com evidências de tal forma de reprodução, a estimativas tendenciosas de \hat{s} . Em tais situações, é importante acessar a proporção de sementes apomíticas produzidas através de uma metodologia estatística específica.

c) Detecção de Apomixia a partir de Isoenzimas

Crestana (1993) detectou apomixia na população de *G. americana*, aqui em estudo, e como o modelo de acasalamento misto de Ritland não diferencia os indivíduos originados de autofecundação dos apomíticos [Murawski & Hamrick (1992b); Murawski et al. (1994)], testou-se a existência de tal forma de reprodução através de isoenzimas. Como em um loco dialélico a segregação ocorre na proporção 1:1 e,

portanto, a frequência mínima esperada de indivíduos heterozigóticos na prole de um genótipo materno heterozigoto é 0,5, independentemente da forma de reprodução (autofecundação, cruzamento e apomixia), eliminando-se as progênies originadas a partir de cruzamentos (caso em que os filhos são heterozigóticos para um loco em que a mãe é homozigótica), sobrarão apenas os indivíduos gerados por cruzamentos endogâmicos, autofecundação (impossível neste caso, visto que a espécie é dióica) e/ou apomítico. O excesso significativo de heterozigotos (acima de 50%), pode ser atribuído a apomixia. Assim, testou-se a frequência de indivíduos heterozigóticos observados, contra a frequência esperada de heterozigotos, para cada loco, em cada família e para a soma total das famílias, através do teste de χ^2 , de acordo com a Tabela 12, proposta por Vencovsky (inf. pessoal). Para aplicação do teste assume-se que não existe seleção atuando.

Tabela 12. Teste de χ^2 para detectar a existência de apomixia em *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Classes	n_o	n_e	χ^2
Heterozigotos	$\sum P_{ij}$	$0,5 \times \sum P_{..}$	$(n_o - n_e)^2/n_e$
Homozigotos	$\sum P_{ij}$	$0,5 \times \sum P_{..}$	$(n_o - n_e)^2/n_e$
Total	$\sum P_{..}$	$\sum P_{..}$	$\sum [(n_o - n_e)^2/n_e]$

Os graus de liberdade foram dados por: $GL = (l-1)(c-1)$, onde: $l =$ classes (2) e $c =$ colunas (2).

d) Teste de Ajuste dos Dados às Pressuposições do Modelo de Ritland

d1) Diferenças Entre Frequências Alélicas do Pólen e dos Óvulos

Para verificar se os genótipos maternos cruzam na mesma taxa na população, comparou-se as frequências alélicas entre pólen e óvulos, através da estimativa de \hat{F}_{ST} de Wright (1965) para cada loco, segundo a expressão:

$$\hat{F}_{ST} = \hat{\sigma}_{p_i}^2 / [\bar{p}_i (1 - \bar{p}_i)]$$

onde: $\hat{\sigma}_{p_i}^2 =$ variância entre as frequências alélicas dos óvulos e do pólen;

\bar{p}_i = frequência alélica média entre óvulos e pólen do *i*ésimo alelo.

As estimativas de \hat{F}_{ST} para locos com três alelos, foram feitas a partir de Vencovsky, 1993.

$$\hat{F}_{ST} = 1 - [\hat{H}_e / (\bar{p}\bar{q} + \bar{p}\bar{r} + \bar{q}\bar{r})]$$

onde:

$\hat{H}_e = 1 - [2(\bar{p}\bar{q} + \bar{p}\bar{r} + \bar{q}\bar{r})]$ = heterozigosidade média esperada entre famílias para cada loco;

p, q, r = frequência alélica média entre famílias.

O \hat{F}_{ST} também foi usado para estimar se o conjunto de pólen é homogêneo na população. Este teste foi realizado considerando-se as famílias como sendo SPop's e submetendo-as ao programa BIOSYS-1, de Swofford & Selander (1989). Desta forma, obtêm-se a diferença nas frequências alélicas polínicas contribuintes para a formação das progênes.

Para testar a significância de \hat{F}_{ST} , para cada loco, aplicou-se o $\chi^2 = 2N\hat{F}_{ST}(k-1)$, GL = (k-1)(s-1), onde: N = tamanho médio da amostra, K = número de alelos e s = número de SPop's (Workman & Niswander, 1970).

d2) Divergências Alélicas (\hat{F}_{ST}) Entre Óvulos x Plantas Femininas

O teste para verificar se os óvulos das plântulas eram diferentes dos óvulos das plantas femininas da população, foi o \hat{F}_{ST} de Wright (1965), descrito no item anterior. Este teste permite detectar se os óvulos, contribuintes para a formação dos zigotos, foram representativos da população. A significância de \hat{F}_{ST} , foi testada a partir de Workman & Niswander (1970), conforme abordado anteriormente.

3.2.7.3. Distribuição Espacial dos Genótipos

Com o intuito de analisar a estrutura genética espacial da população, procedeu-se à análise espacial dos genótipos através da autocorrelação, conforme Sokal & Oden (1978a, b) e Dewey & Heywood (1988). O programa utilizado foi o "Autocorr",

confeccionado por Jonh S. Heywood. A autocorrelação foi feita para os locos polimórficos detectados nos indivíduos adultos, separadamente nas duas SPop's, visando a detectar com maior acuidade a existência de estruturação familiar, isto é, a similaridade genética entre indivíduos adjacentes. A análise de autocorrelação considera cada alelo (p_i) como uma variável; assim, cada genótipo homocigoto recebe o valor de $p_i = 1,0$, o heterocigoto $p_i = 0,5$, 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.

A caracterização da estrutura espacial, partir do índice I de Moran, de acordo com Sokal & Oden (1978a). Desta forma, os pares de indivíduos amostrados foram classificados de acordo com a distância Euclidiana d_{ij} , sendo que a classe k inclui d_{ij} , satisfazendo $k - 1 \leq d_{ij} < k$, onde: k vai de 1 a 10. Foram utilizados intervalos de 3 metros de distância. O índice I de Moran para classe K foi calculado pela expressão:

$$I(k) = n \sum_r \sum_{j(i \neq j)} W_{ij} z_i z_j / (S \sum_i z_i^2)$$

onde: $z_i = p_i - p$, sendo p a média de p_i ; $w_{ij} = 1$ se a distância entre o i ésimo e j ésimo planta for classificada dentro da classe k ; do contrário w_{ij} é zero e n é o número total de amostras. Sob a hipótese de aleatoriedade, $I(k)$ tem o valor esperado de $\mu_1 = -1/(n-1)$ para todos os k . Então, se um alelo é distribuído aleatoriamente para a classe k , a normalidade $I(k)$ para o genótipo da planta, $\hat{\sigma}_k = [I(K) - \mu_1] / \mu_2^{1/2}$, é assintoticamente gaussiano com um valor esperado próximo a zero [$E = -1/(n-1)$]. Assim, quando $\hat{\sigma}_k$ exceder 1,96 e 2,58, I será significativa a um nível de 95 e 99% de probabilidade, respectivamente.

O índice I de Moran pode assumir valor entre -1 e +1, sendo que -1 significa que os indivíduos pareados são completamente diferentes. O valor +1, significa que os indivíduos pareados são idênticos. Valor zero significa ausência de autocorrelação, isto é, os indivíduos estão aleatoriamente distribuídos no espaço.

Utilizou-se três métodos de autocorrelação para a análise da distribuição espacial dos genótipos de *G. americana*: conexão de Gabriel, vizinho mais próximo e comparações dentro de classes de distâncias preestabelecidas. A conexão de Gabriel

compara dois indivíduos A e B, que recebem peso 1 se nenhum indivíduo ocorrer sobre ou dentro do círculo cujo diâmetro é o segmento da reta AB (Sokal & Oden, 1978a). Segundo Gandara (1996), neste tipo de análise, mais indivíduos são pareados com indivíduos circundantes. Na análise do vizinho mais próximo, pares de indivíduos adjacentes recebem peso de $w = 1$, e todos os demais pares, valor $w = 0$ (Sokal & Oden, 1978a). Já, na análise por classes de distâncias, todos os pares de indivíduos comparados, que apresentem a distância entre si incluída em um intervalo preestabelecido, recebem peso 1, e as demais comparações recebem valor zero (Gandara, 1996). Preestabeleceu-se 4 classes de distâncias na SPop1, 7 classes na SPop2, objetivando um número de conexões mínimas em torno de 30. Para maior evidência do comportamento da distribuição espacial dos genótipos por classes de distância, construiu-se gráficos (correlogramas).

3.2.7.4. Estimativa do Fluxo Gênico (\hat{N}_m)

O fluxo gênico foi obtido a partir da metodologia proposta por Wright (1951), entre a quantidade de migrantes (\hat{N}_m) e a divergência genética entre populações (\hat{F}_{ST}).

$$\hat{F}_{ST} = \frac{1}{(1 + 4\hat{N}_m)} \quad \text{ou} \quad \hat{N}_m = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{\hat{F}_{ST}} + 1 \right)$$

sendo:

N = número de indivíduos migrantes da população;

m = taxa de migração.

De acordo com Cockerham & Weir (1993), o emprego de $\hat{\theta}_p$ como estimador da divergência genética entre populações é mais adequado do que \hat{F}_{ST} .

Estimou-se ainda o tamanho da vizinhança (\hat{N}_b), o que corresponde ao número médio de indivíduos numa área de vizinhança ou à área onde ocorre panmixia, conforme Wright, citado por Reis (1996), para modelos contínuos, como o isolamento por distância.

Portanto: $\hat{N}_b = 2\pi \hat{N}m$

Deste modo, foi possível estimar a área de vizinhança (\hat{A}_v):

$$\hat{A}_v = D \hat{N}_b$$

3.2.7.5. Estimativa do Tamanho Efetivo da População (\hat{N}_e)

O tamanho efetivo populacional para plantas adultas foi estimado pelas expressões apresentadas abaixo, adaptadas de Crow & Kimura (1970) por Vencovsky (inf. pessoal). A adaptação foi necessária, pois o número de plantas masculinas e femininas amostradas era desigual. Para esta estimativa, pressupôs-se que não existiam diferenças nas frequências alélicas entre sexos.

Variância média total populacional para plantas femininas:

$$\frac{\hat{\sigma}_F^2}{2\hat{N}_{eF}} = \frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{2\hat{N}_{eF}} = \frac{\hat{\sigma}_I^2}{N_f} + \frac{\hat{\sigma}_G^2}{2N_f}$$

Variância média total populacional para plantas masculinas:

$$\frac{\hat{\sigma}_M^2}{2\hat{N}_{eM}} = \frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{2\hat{N}_{eM}} = \frac{\hat{\sigma}_I^2}{N_m} + \frac{\hat{\sigma}_G^2}{2N_m}$$

assim:
$$\frac{\hat{\sigma}_{FM}^2}{2\hat{N}_e} = W_F^2 \frac{\hat{\sigma}_F^2}{2\hat{N}_{eF}} + W_M^2 \frac{\hat{\sigma}_M^2}{2\hat{N}_{eM}} = \frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{2\hat{N}_e}$$

sendo:
$$W_F = \frac{N_f}{N_f + N_m} ; \quad W_M = \frac{N_m}{N_f + N_m}$$

onde:

$$\bar{p}(1-\bar{p}) = \frac{\hat{\sigma}_T^2}{2}$$

\bar{p} = frequência alélica média;

$\frac{\hat{\sigma}_T^2}{2}$ = variância total;

N_f = número de plantas femininas;

N_m = número de plantas masculinas.

Para as plântulas, \hat{N}_e foi estimado pela expressão apresentada por Vencovsky (1992) para plantas monóicas (flores díclinas e hermafroditas), visto que não é possível separar os sexos das plântulas:

$$\frac{\hat{\sigma}_T^2}{2\hat{N}_e} = \frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{2\hat{N}_e} = \frac{\hat{\sigma}_F^2}{m} + \frac{\hat{\sigma}_I^2}{nm} + \frac{\hat{\sigma}_G^2}{2nm}$$

onde:

n = número de indivíduos;

m = número de famílias.

Expressões que podem servir como orientação para estratégias de amostragem de germoplasmas ou mesmo visando à coleta de sementes para fins de reflorestamentos, em função da grandeza observada das componentes da variância. A escolha dos números adequados de m e n deve minimizar a variância média ($\hat{\sigma}_T^2$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sistemas Isoenzimáticos

Foram testados 23 sistemas de coloração *in vitro* em três sistemas de tampão eletrodo/gel, conforme já apresentado nas Tabelas 2 e 3. 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 (Figura 2) 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. Fosfoglucoose 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

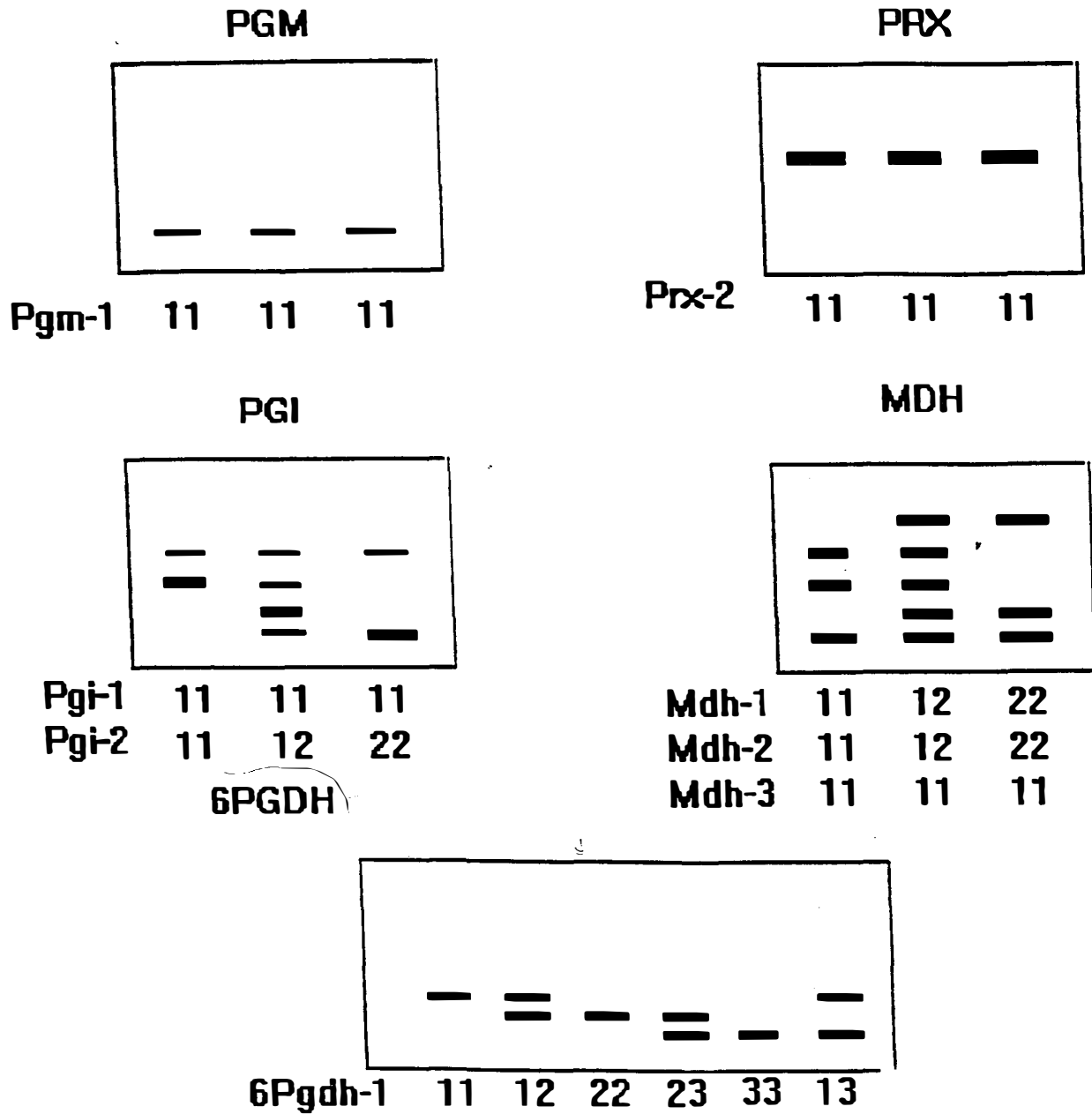


Figura 3. Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *G. americana*, nos locos Pgm-1, 6Pgdh-1, Pgi-1, Pgi-2, Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3 e Prx-1, juntamente com seus respectivos genótipos. Piracicaba, SP, ESALQ/USP, 1997.

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. Variabilidade Genética

A hipótese de que ambas as 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.

4.2.1. Frequências Alélicas

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 13). As frequências alélicas foram obtidas para SPop's e para a população de plantas adultas e plântulas, procurando-se facilitar algumas comparações e interpretações genéticas.

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 às plantas adultas 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 dos acasalamentos nas SPop's. Apesar dessa variação, não se detectaram a ausência de nenhum alelo nas SPop's de adultos e plântulas, portanto, ambas 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 quantificadores da estrutura genética das SPop's e índices de diversidade intrapopulacionais.

Tabela 13. 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. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

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	42	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	42	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

4.2.2. Estrutura Genética das SPop's

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das SPop's foi caracterizada a partir da análise de variância de frequências alélicas (Cockerham, 1969; Weir, 1990; Vencovsky, 1992), por apresentar menos viés do que a diversidade genética

de Nei (1973) e estatísticas F de Wright (1965), visto que considera o processo amostral nas estimativas em questão (genes, indivíduos, famílias e SPop's).

As estimativas dos coeficientes de coancestralidade (Tabela 14) permitem obter a distribuição da variabilidade genética nos vários níveis hierárquicos da análise de variância para 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} . As estimativas de \hat{f} fornecem os níveis de fixação alélica ao nível de média de SPop's e \hat{F} para o total das SPop's. O \hat{f} é uma média ponderada da fixação alélica entre SPop's.

Tabela 14. Coeficientes de coancestralidade entre duas SPop's de adultos e plântulas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	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 14), 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 intraclasses maiores do que entreclasses, 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, já que houve falha do marcador e as enzimas parecem não ser totalmente neutras, estando sobre ação de forças seletivas. Na presença de seleção o modelo de Cockerham não é adequado

porque assume que as variações nas frequências gênicas são devido exclusivamente a deriva genética.

Dados os baixos valores de divergência observados entre as SPop's, para adultos e plântulas, as diferenças entre as SPop's podem ser consideradas negligíveis, 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. Concordantemente, 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 próximos 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 acentuada endogamia na população, que no caso da *G. americana*, que é dióica, só pode ser fruto de acasalamento

entre aparentados. Desvios do EHW e acasalamentos endogâmicos já eram previsto 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.

O coeficiente de coancestralidade entre plantas, dentro de famílias, dentro de SPop's ($\hat{\theta}_F$), foi em média alto (0,160), indicando a existência de acasalamentos entre aparentados. Em plântulas de meio irmãos, se os acasalamentos forem originados a partir de indivíduos sem nenhum grau de parentesco, o valor máximo assumido por $\hat{\theta}_F$ é de 0,125 (1/8), posto que valores acima indicam a existência de acasalamentos 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 $\hat{\theta}_F$.

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; b) a divergência genética entre SPop's ($\hat{\theta}_p$) 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.

4.2.3. Índices de Diversidade Intrapopulacionais

Os índices estimados foram o número médio de alelos por locos (A), a porcentagem de locos polimórficos (P ao critério de 99% de probabilidade) a heterozigosidade média observada (H_o) e a heterozigosidade média esperada (\hat{H}_e) segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 15). Na referida tabela é apresentado também o tamanho da amostra (N),

Tabela 15. Índices de diversidade intrapopulacionais em população de adultos e plântulas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	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)
H_o	0,195 (0,068)	0,105(0,055)
\hat{H}_e	0,182 (0,054)	0,149 (0,083)

O número médio de alelos por locos (A) foi baixo e não variou entre adultos e plântulas ($1,63 \pm 0,26$). Para a estimativa de A considerou-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 já 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 alto. Entretanto, comparando-se o P encontrado 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 (1986a),

observamos valores bem inferiores à primeira espécie, mas muito próximos à segunda. A análise do P nos mostra que a *G. americana* apresenta um polimórfimo médio, o que torna a população favorável à conservação genética.

A H_o observada foi alta para os adultos (0,195) e relativamente baixa para as plântulas (0,105). Já \hat{H}_e foi alta para ambos adultos e 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 adultos e de homozigotos para as plântulas, em outras palavras, significando que a heterozigosidade observada nos adultos foi maior que a esperada se a população estivesse em equilíbrio de EHW, contrariamente ao que ocorreu com as plântulas. Este resultado sugere a hipótese de seleção em favor dos heterozigotos, reforçando o observado pela estatística F, obtidos da análise de variância (\hat{f} e \hat{F} , Tabela 14).

Comparando-se \hat{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 encontrados. Todavia, quando se compara \hat{H}_e , com espécies arbóreas tropicais de alta densidade, da família Rubiaceae, 0,374 (*Alseis blachiana*) e 0,152 (*Psychotria horizontalis*) e na média de 16 espécies arbóreas tropicais comuns, 0,211 (Hamrick & Lovelless, 1989), observa-se que a heterozigosidade de *G. americana* foi bem inferior à encontrada para a primeira espécie, superior à segunda e próxima à terceira. Moraes (1993), estudando plântulas de *M. urundeuva* (díóica), em duas populações, obteve heterozigosidades (0,140 e 0,160) próximas às encontradas aqui. Tais resultados mostram para a *G. americana* um comportamento médio da heterozigosidade observada e que a espécie é potencialmente apta à conservação.

No entanto, comparando-se H_o , 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., observamos valores médios muito superiores aos encontrado 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 Mojiguaçu, objetivando detectar a extensão do fluxo gênico pela água.

O índice de fixação de Wright (\hat{f}), obtido para adultos e plântulas (Tabela 14), 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, 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 16. Índices de fixação de Wright (\hat{f}) para plantas adultas e plântulas em 4 locos polimórficos em *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	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.

Nas plântulas das famílias, 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 homozigotos e que as frequências gênicas observadas se desviam das frequências 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 ao assincronismo na antese das flores masculinas e femininas, ou, ainda, ao comportamento dos polinizadores, visitando sempre as mesmas plantas.

Comparando a média de \hat{f} , entre adultos e plântulas, observa-se endogamia acentuada nas plântulas e um pequeno excesso de heterozigotos nos adultos, apontando, concordantemente aos resultados já observados, a existência de seleção em favor de heterozigotos, entre a fase de plântula e a adulta. A seleção dá a entender que os acasalamentos, na população, geram uma grande quantidade de sementes endogâmicas a cada ciclo reprodutivo, mesmo considerando-se que as plantas adultas contenham alta heterozigosidade e estejam em EHW. A seleção natural elimina as sementes endogâmicas, permitindo que só sementes heterozigóticas desenvolvam um indivíduo adulto. 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 heterozigóticos se estabeleçam na população e venham a se reproduzir, garantindo a manutenção dos níveis de heterozigosidade da população. Murawski (1995) comparou o \hat{f} entre adultos e plântulas em várias espécies arbóreas tropicais (Tabela 17). A autora observou, igualmente como aqui, que as plantas adultas apresentavam valores quase sempre negativos, enquanto que nas plântulas os valores eram quase sempre positivos, ou mesmo quando ambos adultos e plântulas apresentavam valores positivos ou negativos, os níveis de fixação alélica eram sempre maiores nas plântulas e menores nos adultos. No entanto, Lepsch-Cunha (1996), estudando *Couratari multiflora*, na Amazonia, 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 o comportamento da seleção entre a fase juvenil e adulta.

Tabela 17. Comparação entre \hat{f} em adultos e plântulas, em várias espécies arbóreas tropicais, adaptado de Murawski (1995). Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Família/Espécies	\hat{f} Adultos	\hat{f} Plântulas
Arecaceae		
<i>Astrocaryum mexicanum</i> ¹	-0,410	-0,190
Bombacaceae		
<i>Cavanillesia platanifolia</i> ²		
1987	-0,198	0,275
1988	-0,198	0,475
1989	-0,198	0,649
<i>Ceiba pentandra</i> ³	-0,297	0,184
<i>Quararibea asterolepis</i> ²	-0,046	0,000
Dipterocarpaceae		
<i>Shorea congestiflora</i> ⁴	0,088	0,067
<i>Shorea magistophylla</i> ⁵	-0,247	0,151
<i>Shorea trapezifolia</i> ⁴		
1990	-0,060	0,295
1991	-0,300	0,237
<i>Stemonoporus oblongifolius</i> ⁶	-0,101	0,085
Lauraceae		
<i>Beilschmedia pendula</i> ³	-0,300	0,043
Lecythidaceae		
<i>Couratari multiflora</i> ¹¹	0,176	0,114
Meliaceae		
<i>Brosimum alicastrum</i> ³	-0,271	0,067
<i>Cedrela fissilis</i> ⁷	0,086	0,150
Palmae		
<i>Euterpe edulis</i> ⁸	-0,033	0,076
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> ⁹	-0,060	0,295
<i>Psychotria faxucens</i> ¹⁰	0,075	0,128
Média	-0,127	0,172

1: Eguarte et al., 1992; 2: Murawski et al., 1990; 3: Murawski & Hamrick, 1992a; 4: Murawski et al., 1994; 5: Murawski & Hamrick, 1991; 6: Murawski & Bawa., 1994; 7: Gandara, 1996; 8: Reis, 1996; 9: Sebbenn, este trabalho; 10: Pérez-Nasser et al., 1993; 11: Lepsch-Cunha, 1996.

A endogamia expressa pelos \hat{f} , para as plântulas, provavelmente está associada à existência de estruturação genética espacial. Para o caso da *G. americana*, que é dióica, a estruturação deve estar relacionada à indivíduos de sexos diferentes, por ser esta a única forma de ocorrer os acasalamentos, portanto, 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 - Servília), 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 Servilia, pressupondo para a primeira, maior grau de estruturação familiar.

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 heterozigotos, mostram a população de *G. americana* com potencial para a conservação *in situ*. O potencial evolutivo da população permitirá a adaptação às mudanças ambientais futuras, que por ventura poderão acontecer, dado o grande número de novas recombinações genotípicas, possíveis de ocorrer, para manutenção da variabilidade genética existente e formação das próximas gerações.

Para uma espécie fortemente de exocruzamento, como a *G. americana*, é esperado que todos os descendentes sejam originados de cruzamentos, portanto, a taxa de cruzamento esperada neste caso é de 1,0. Entretanto, os adultos, apesar de estarem em EHW, geraram plântulas fora deste equilíbrio, sugerindo a existência de acasalamentos entre aparentados e/ou preferenciais, o que provavelmente causará alterações na taxa de cruzamento. Partindo-se desta hipótese, realizaram-se o estudo do sistema reprodutivo da espécie, a partir de isoenzimas.

4.3. Sistema Reprodutivo

4.3.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

O EHW é baseado em premissas de acasalamentos aleatórios, ausência de mutação, migração, deriva genética, seleção e tamanho infinito das populações (Metter & Gregg, 1973; Futuyma, 1986). Devido à pressuposição de acasalamentos aleatórios, a avaliação da existência de EHW nas populações pode ser uma forma inicial de abordar o sistema reprodutivo de uma espécie (Reis, 1996). A par disso, os indivíduos adultos e as plântulas da população de *G. americana* foram submetidas ao teste de EHW, comparando-se os genótipos isoenzimáticos observados com os esperados pelos pressupostos do modelo (Tabela 18). O teste de qui-quadrado (χ^2) não-agrupado foi priorizado relativamente ao teste agrupado e este, por sua vez, ao teste exato de Fisher quando o número de genótipos esperados (n_e) não foi inferior a 1,00.

Os testes de χ^2 de aderência dos genótipos dos indivíduos adultos ao EHW não revelaram desvios significativos do modelo para os quatro locos analisados. Isto sugere que os acasalamentos ocorrem de forma aleatória na população, tendo, teoricamente, todos os indivíduos a mesma probabilidade de se acasalar com quaisquer outros indivíduos da população. Este comportamento confirma o observado para os índices de fixação de Wright (Tabela 14 e 16) que, na média dos locos não foram muito diferentes de zero para os adultos, sugerindo EHW para a população. Se a população se mantiver em EHW, teoricamente não existirão perdas na variabilidade genética e a população manterá o mesmo padrão de variabilidade por infinitas gerações. Os testes de aderência ao EHW, para as plântulas, detectaram desvios significativos do modelo em 50% dos locos analisados (6Pgdh-1 e Pgi-2). A não aderência de ambos os locos foi

devida ao *déficit* de heterozigotos observados relativamente ao número de heterozigotos esperados pelo modelo. Os desvios de EHW, para as plântulas, mostraram que os acasalamentos na população não foram aleatórios, mesmo considerando-se que os adultos se encontram em EHW. Isto indica que devem estar ocorrendo acasalamentos entre indivíduos aparentados levando a um certo grau de endogamia na população.

Tabela 18. Teste de qui-quadrado (χ^2) não-agrupado ^(a), agrupado ^(b) e exato de Fisher ^(c) ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, em adultos e plântulas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Loco	Classe	Adultos			Plântulas		
		n _o	n _e	χ^2	n _o	n _e	χ^2
6Pgdh-1	1	11	11,27	0,000	88	63,25	37,279
	2	21	20,45	(1)	78	127,50	(1)
	3	9	9,27	0,991 ns ^(b)	89	64,25	0,000 ** ^(b)
Pgi-2	1-1	6	9,05	2,766	92	76,51	12,266
	1-2	27	20,89	(1)	118	148,97	(1)
	2-2	9	12,05	0,096 ns ^(a)	88	72,51	0,000 ** ^(a)
Mdh-1	1	34	34,38		260	260,20	
	2	8	7,24		15	14,59	
	3	0	0,38	1,000 ns ^(c)	0	0,21	1,000 ns ^(c)
Mdh-2	1	33	33,48		265	265,50	
	2	9	8,04		24	23,00	
	3	0	0,48	1,000 ns ^(c)	0	0,50	1,000 ns ^(c)

$\leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Quando o n_o e n_e contêm genótipos em todas as classes (ex. 1-1, 1-2, 2-2), o valor de χ^2 é o não-agrupado; já, quando em alguma classe, o valor de n_o e n_e é menor que um, os genótipos estão agrupados nas seguintes classes: 1: número de homozigotos para o alelo mais comum; 2: número de heterozigotos entre o alelo mais comum e os alelos mais raros; 3: número de homozigotos raros e outros heterozigotos.

A endogamia nas plântulas já havia sido detectada pelos altos índices de fixação alélica (Tabela 14 e 16). Contudo, desvios do EHW podem estar associados a outros fatores, como deriva genética, seleção, mutação ou tamanho finito da população e não propriamente ao sistema reprodutivo. Desta forma, é importante testar se os locos que não se adequaram ao modelo proposto por Hardy-Weinberg estão em equilíbrio de endogamia de Wright, o qual separa a endogamia, devido ao sistema misto de reprodução, do efeito de outros fatores não ligados ao sistema reprodutivo. A adequação dos dados ao modelo de Wright pressupõe endogamia gerada por autofecundação e/ou acasalamentos entre aparentados.

4.3.2. Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW)

Dos dois locos que apresentaram desvios do EHW, apenas o 6Pgdh-1 foi passível de ser submetido ao teste de EEW, dado que só este apresentava o número mínimo de alelos por loco exigido para sua aplicação. O χ^2 é testado com um grau de liberdade a menos, perdido devido ao \hat{f} [GL = ((l-1)(n-1)-1), onde: l = número de locos; n = número de alelos], por isso somente pode ser aplicado em locos que apresentam três ou mais alelos (Tabela 19). O teste considera a possibilidade do sistema de acasalamento misto (cruzamentos aleatórios e autofecundação).

Tabela 19. Teste de χ^2 para aderência dos genótipos do loco 6Pgdh-1 ao EEW em plântulas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Classe	n_o	n_e	χ^2
1-1	85	113,88	7,32
1-2	55	33,75	13,38
1-3	0	15,71	15,75
2-2	88	51,49	25,89
2-3	23	12,83	8,06
3-3	4	27,34	19,92
			90,29 (2) **

** P \leq 0,01.

O teste de χ^2 para o loco 6Pgdh-1 rejeitou a hipótese de que o déficit de heterozigotos possa ser atribuído somente ao sistema de acasalamento misto, indicando a existência de outros fatores envolvidos, como cruzamentos não aleatórios, entre aparentados ou seleção. Segundo Crestana (1993), em meados do mês de novembro, já existe uma pequena quantidade de flores estaminadas abertas, sendo que o pico da florada ocorre em meados de janeiro. Por sua vez, a antese das flores pistiladas 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. Entretanto, possibilita acasalamentos preferenciais entre os poucos indivíduos masculinos floridos, no início e pico da florada feminina, com as plantas femininas. Isto porque nem todos os indivíduos estão na mesma fase fenológica ou têm a possibilidade de serem visitados por polinizadores ao mesmo

tempo. Crestana (1993) observou apomixia (agamospermia) na população, que todas as flores pistiladas formaram 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 certo assincronismo na florada masculina e feminina, insinua possibilidade das flores não polinizadas gerarem sementes apomíticas.

Interessante se faz considerar que nesse ciclo reprodutivo ocorreram acasalamentos não aleatórios com a produção de sementes fora do EHW e EEW, mesmo considerando-se que os indivíduos adultos se encontram em EHW. Isso reforça-se a hipótese anteriormente levantada sobre existência de seleção favorecendo o recrutamento de descendentes heterozigóticos, entre a fase de plântula e a fase adulta.

A análise da taxa de cruzamento fornece um quadro mais claro da forma de acasalamento da espécie. Antes das estimativas de cruzamentos, testaram-se a adequação dos dados ao modelo de acasalamento misto de Ritland & Jain (1981).

4.3.3. Aderência dos Dados ao Modelo Multilocos

A aderência dos locos ao modelo multilocos foi testada a partir do teste de χ^2 (Tabela 20). O teste de χ^2 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). Desvios do modelo não prejudicam as estimativas \hat{i}_s e \hat{i}_m , mas indicam a existência de outros fatores atuando no processo, como cruzamentos preferenciais e/ou entre aparentados (Ritland & El-Kassby, 1985). Entretanto, a inclusão de locos que não se adequam ao modelo multilocos, nas estimativas de \hat{i}_s e \hat{i}_m , causa tendenciosidade, porém, em menor grau do que as estimativas que incluam taxas de cruzamentos individuais por famílias que não apresentem convergência. Quando \hat{i}_s ou \hat{i}_m , para um família, resultar em valor exatamente igual a 2,0, significa que não foi possível sua estimativa, isto é, a estimativa de cruzamento não convergiu. Esta taxa pode ser tanto 0,0 como 1,0, portanto esta família deve ser excluída da análise, para não causar tendenciosidade nas estimativas de cruzamento (Ritland, 1990).

Tabela 20. Teste de χ^2 para aderência dos locos ao modelo multilocos e estimativas de máxima verossimilhança de frequências alélicas dos óvulos e do pólen, contribuintes para o conjunto gênico das sementes de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

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

Um dos fatores mais comuns que leva a desvios do modelo multilocos é a heterogeneidade nas frequências alélicas dos óvulos e do pólen (Reis, 1996). Desvios do modelo podem também estar associados às diferenças genéticas nas funções masculinas e femininas, à presença de pólen imigrante na população amostrada, à seleção entre o tempo de polinização e amostragem das plântulas ou, ainda, à amostragem não representativa das árvores maternas (Murawski & Hamrick, 1992a).

Os testes para verificar a existência de diferenças nas frequências alélicas entre óvulos e pólen, entre sexos, entre óvulos das plântulas e óvulos das plantas adultas femininas da população e se o pólen que contribuiu para os cruzamentos foi homogêneo na população, são apresentados na Tabela 21. Esses testes foram realizados através da divergência genética entre frequências alélicas (\hat{F}_{ST} - Wright, 1965) e a significância de \hat{F}_{ST} foi dada pelo teste de χ^2 proposto por Workman & Niswander (1970).

Os valores de \hat{F}_{ST} comparando a heterogeneidade nas frequências alélicas dos óvulos e do pólen (Tabela 21), foram baixos para todos os locos e para a média, mas estatisticamente diferente de zero para o loco Pgi-2 e para a média. Isto significa que a divergência genética entre o pólen e os óvulos é baixa (<1,0%), assim, não foi possível atribuir a não adequação das frequências alélicas dos óvulos e do pólen ao modelo multilocos.

Tabela 21. \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*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Locos	Pólen x Óvulos		Masculinos x Femininos		Óvulo x femininas		Heterogeneidade do pólen	
	\hat{F}_{ST}	χ^2	\hat{F}_{ST}	χ^2	\hat{F}_{ST}	χ^2	\hat{F}_{ST}	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 & Niswander, 1970); b: teste Z.

Os valores de \hat{F}_{ST} para diferenças entre sexos foram baixos e não diferentes de zero para todos os locos, a partir do teste de χ^2 . Contudo, a média de \hat{F}_{ST} , apesar de ser baixa, foi significativamente diferente de zero pelo teste z. Todavia, este resultado não permite atribuir os desvios do modelo multilocos às diferenças nas frequências alélicas entre sexos. De acordo com Guerra (inf. pessoal), *G. americana* não possui cromossomo sexual e as diferenças entre sexos são determinadas por genes autossômicos. Esses genes podem levar a diferenças nas frequências alélicas entre plantas masculinas e femininas, causando desvios do modelo multilocos. Entretanto, no caso da *G. americana*, não é possível atribuir os desvios do modelo à função sexual.

A divergência entre as frequências alélicas (\hat{F}_{ST}) dos óvulos que geraram as progênes e das plantas adultas femininas amostradas foram baixos em todos os locos e na média, apesar de significativamente diferentes de zero para o loco Mdh-1. Isto mostra que as matrizes que deram origem às plântulas foram representativas das árvores femininas da população, portanto esta não foi a causa dos desvios do modelo multilocos.

As diferenças entre o conjunto de pólen contribuinte da polinização das famílias (\hat{F}_{ST}) foram significativas para todos os locos e para a média, e altas nos locos 6Pgdh-1, Pgi-2 e na média, indicando que o conjunto de pólen que contribuiu para os acasalamentos não foi aleatório. Isto implica em que as famílias receberam pólen diferenciado nos cruzamentos, resultando em acasalamentos preferenciais na população. A distribuição não aleatória do conjunto de pólen vai de encontro a um dos pressupostos

básicos do modelo de Ritland & Jain (1981), podendo contribuir para desvios na estimativa da \hat{i}_m . Os acasalamentos preferenciais podem estar associados à visita do polinizador às árvores próximas, ao assincronismo no florescimento de plantas masculinas e femininas, ou ainda à existência de estruturação espacial na população, gerando endogamia.

Dado que, como dito anteriormente, a inclusão de locos que não se adequam ao modelo multilocos não causam grandes alterações nas estimativas de cruzamento e devido ao pequeno número de locos polimórficos analisados para *G. americana*, mantiveram-se todos os loco nas respectivas estimativas de \hat{i}_s e \hat{i}_m , desconsiderando-se os desvios do modelo. Murawsky et al. (1990) estimaram \hat{i}_m e \hat{i}_s para *Cavanillesia platanifolia* e *Quararibea asterolepis*, a partir de locos com desvios significativos do modelo multilocos. Murawski et al. (1994) estimaram \hat{i}_m para *Shorea congestiflora* a partir de 6 locos isoenzimáticos e para *S. trapezifolia*, através de 2 locos, desconsiderando seus desvios do modelo. Neste mesmo trabalho, a autora estimou as mesmas taxas de cruzamentos para *S. trapezifolia*, em um segundo ciclo reprodutivo, desta vez a partir de 4 locos, sendo que dois apresentaram desvios do modelo multilocos.

4.3.4. Taxa de Cruzamento

A caracterização da taxa de cruzamento na população (Tabela 22) foi abordada a partir da taxa de cruzamento aparente (\hat{i}_a), uniloco (\hat{i}_s) e multilocos (\hat{i}_m). A \hat{i}_a foi estimada pelo método dos momentos, através do \hat{f} , baseado em Weir (1990) e Vencovsky (1994). A \hat{i}_s e \hat{i}_m foram obtidos a partir da estimativa de máxima verossimilhança (Ritland & Jain, 1981), pelo programa MLT de Ritland (1990). Diferenças positivas entre \hat{i}_m e \hat{i}_s ($\hat{i}_m - \hat{i}_s$) permitem obter a taxa de cruzamento entre aparentados (Shaw & Allard, 1982; Ritland & El-Kassaby, 1985; Ritland, 1990) e diferenças positivas entre \hat{i}_m e 1,0 permitem obter a taxa de autofecundação (\hat{s}) na população (Ritland, 1990). Entretanto, o modelo multilocos não distingue autofecundação de apomixia, levando, no caso de espécies com evidências de agamospermia, a estimativas

tendenciosas de \hat{s} (Murawski & Hamrick, 1992b; Murawski et al., 1994). Em tais situações, é importante acessar a proporção de sementes originadas de apomixia através de uma metodologia estatística específica, a fim de que não sejam tiradas conclusões errôneas sobre a forma de reprodução das espécies.

O modelo multilocos permite obter a proporção de acasalamentos endogâmicos devido à \hat{t}_s ser obtida separadamente loco a loco, portanto, através de menos informações sobre frequências gênicas de pólen e óvulos, do que a estimativa multilocos que considera simultaneamente vários locos no cálculo da taxa de cruzamento. A taxa de multilocos tem mais recursos para separar sementes originadas de cruzamentos da autofecundação, visto que os casos duvidosos de um loco são esclarecidos por outros locos. A taxa unilocos confunde, muitas vezes, acasalamentos entre aparentados com autofecundação e/ou apomixia e, nestes casos, subestima a taxa de cruzamento e superestima a taxa de autofecundação.

A estimativa de \hat{t}_m foi obtida a partir de 11 das 15 famílias avaliadas na população, devido às taxas de cruzamentos individuais de 4 famílias não convergirem. A estimativa de \hat{t}_c foi feita a partir dos locos que não apresentaram desvios de EEW (ver Tabela 19), visto que locos com desvios deste modelo podem apresentar endogamia advinda de outros fatores (seleção, mutação, migração, deriva genética e tamanho finito da população) e não devido ao sistema misto de reprodução. Estimativas de \hat{t}_c a partir de locos, ou incluindo locos que apresentem desvios do EEW, resultam em estimativas “viciadas”.

Como já mencionado a \hat{t}_m (Tabela 22) é uma estimativa que considera todos os locos nas probabilidades de cruzamentos, sendo portanto, mais próxima da realidade dos acasalamentos na natureza. A \hat{t}_m estimada foi de 0,816 (0,051), revelando que 81,6% das plântulas foram geradas por cruzamentos. A \hat{t}_m estimada por família variou de 0,10 a 1,68. Esta discrepância nas taxas de cruzamentos das famílias deve estar associada ao assincronismo na floração masculina e feminina. Provavelmente as matrizes de número 6, 7 e 11, que apresentaram menor \hat{t}_m , floresceram no início ou no fim do pico da florada masculina da população, fase em que havia menos pólen disponível para os acasalamentos, o que reduziu a produção de sementes por cruzamentos e possivelmente

Tabela 22. Estimativas de \hat{t}_m , \hat{t}_s , \hat{t}_a e \hat{s} para população de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	\hat{t}_m	\hat{t}_s	\hat{t}_a	$\hat{t}_m - \hat{t}_s$	\hat{s}
Fam. 1	1,66				0,00
Fam. 2	1,68				0,00
Fam. 3	1,02				0,00
Fam. 4	1,33				0,00
Fam. 5	1,09				0,00
Fam. 6	0,60				0,40
Fam. 7	0,10				0,90
Fam. 8	1,18				0,00
Fam. 9	1,51				0,00
Fam. 10	1,59				0,00
Fam. 11	0,18				0,82
6Pgdh-1	----	0,800 (0,080)	----	----	----
Pgi-2	----	1,047 (0,094)	----	----	----
Mdh-1	----	0,181 (0,166)	1,057	----	----
Mdh-2	----	0,439 (0,119)	1,090	----	----
População	0,816 (0,051) ¹	0,617 (0,166)	1,095 (0,002) ¹	0,199	0,184

¹: erro padrão da taxa de cruzamento.

possibilitou a apomixia. Infelizmente, esta suposição não pode ser confirmada aqui neste trabalho, dado que não houve um acompanhamento fenológico durante a florada que deu origem às plântulas. Como nenhuma das três matrizes anteriormente mencionadas estava isolada, descarta-se a possibilidade das baixas taxas de cruzamentos serem devido ao isolamento espacial.

As estimativas \hat{t}_s variaram, entre locos, de 0,181 (Mhd-1) a 1,047 (Pgi-2), com média de 0,617. Essa variação entre locos está refletida na magnitude do desvio padrão da média de \hat{t}_s (0,166). O valor alto do desvio padrão é devido a \hat{t}_s ter sido estimado sobre poucos locos (4), sendo que estimativas de variâncias obtidas de poucos dados tendem a aumentar o erro padrão da média.

A \hat{t}_a foi de 1,095, biologicamente igual a 1,00, propondo 100% de cruzamento para a população de *G. americana*, resultado esperado para uma espécie dióica onde o sistema reprodutivo obriga ao cruzamento. Em espécies dióicas não é possível a ocorrência de endogamia na população por autofecundação, mas somente por acasalamento entre indivíduos aparentados.

A diferença entre \hat{i}_m e \hat{i}_s foi de 0,199 e a diferença entre \hat{i}_m e 1,0 (\hat{s}) foi de 0,184. As taxas de cruzamentos obtidas mostram que, neste ciclo de reprodutivo 81,6% das plântulas foram geradas por cruzamentos, sendo: 61,7% entre indivíduos não aparentados e 19,9% entre aparentados e 18,4% por prováveis apomíticos, dado que a espécie é dióica, portanto não ocorre autofecundação. A presença de acasalamentos endogâmicos ou entre relativos confirma os níveis de endogamia sugeridos pelas índices de fixação de Wright e desvios do EEW para as progênies. A endogamia, a partir de cruzamento entre aparentados, cria efeitos menos drásticos em uma geração de acasalamentos do que a autofecundação em uma planta monóica (flores díclinas ou hermafroditas), porém, os mesmos efeitos em algumas gerações de cruzamentos entre aparentados (Allard, 1971).

Como o modelo multilocos não distingue entre as sementes originadas de autofecundação das apomíticas (Murawski & Hamrick, 1992b; Murawski et al., 1994) e tal forma de reprodução foi confirmada em *G. americana* (Crestana 1993) através de outra metodologia, a estimativa de \hat{s} , pode dever-se à existência de agamosperma na população. Crestana (1993), pesquisando o comportamento fenológico da mesma população de *G. americana*, aqui em estudo, após uma análise minuciosa das flores de ambos os sexos e ensaios para detectar apomixia, observou que 60% das flores femininas emasculadas produziram sementes, concluindo que a espécie é funcionalmente dióica, mas pratica acasalamento misto, com reprodução cruzada de, no mínimo, 50% e apomítica de, no máximo, 50%. Assim, como os estudos confirmaram a reprodução apomítica na população e o modelo multilocos não distingue autofecundação de apomixia, testou-se tal forma de reprodução em *G. americana* a partir de dados de isoenzimas.

4.3.5. Apomixia em *G. americana*

A existência de apomixia na população foi testada pelo χ^2 , comparando-se a frequência observada (n_o) de indivíduos que podem ter sido gerados por acasalamentos entre aparentados e/ou apomixia, com o esperado (n_e) em um genótipo materno heterozigótico para um dado loco (Tabela 23). O excesso de heterozigotos observados pode ser atribuído à existência de apomixia na população.

Tabela 23. Teste de χ^2 para detectar apomixia em população de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	Fam. 3 (Pgi-2)			Fam. 5 (6Pgdh-1)		
	no	ne	χ^2	no	ne	χ^2
Heterozigotos.	8	7		3	6,5	
Homozigotos.	4	7	(1)	10	6,5	(1)
Total	14	14	1,43 ns	13	13	3,77 ns
	Fam. 6 (6Pgdh-1)			Fam. 7 (6Pgdh-1)		
	no	ne	χ^2	no	ne	χ^2
Heterozigotos.	1	4,5		3	8	
Homozigotos.	8	4,5	(1)	13	8	(1)
Total	9	9	5,54 *	16	16	6,25 **
	Fam. 7 (Pgi-2)			Fam. 9 (6Pgdh-1)		
	no	ne	χ^2	no	ne	χ^2
Heterozigotos.	10	8		2	5,5	
Homozigotos.	6	8	(1)	9	5,5	(1)
Total	16	16	1,00 ns	11	11	4,45 *
	Fam. 9 (Pgi-2)			Fam. 11 (Pgi-2)		
	no	ne	χ^2	no	ne	χ^2
Heterozigotos.	7	5,5		3	5,5	
Homozigotos.	4	5,5	(1)	8	5,5	(1)
Total	11	11	0,82 ns	11	11	2,27 ns
	Total					
	no	ne	χ^2	no	ne	χ^2
Heterozigotos.	35	48,5				
Homozigotos.	62	48,5	(1)			
Total	97	97	7,51 **			

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Entre parênteses são apresentados os graus de liberdade.

A distribuição de χ^2 não evidenciou excessos significativos de heterozigotos para as diversas famílias analisadas, rejeitando a hipótese de apomixia na população, a partir das isoenzimas. Os valores de χ^2 , significativos, foram atribuídos ao excesso de homozigotos observados e não ao excesso de heterozigotos. Murawski et al. (1990) procuraram detectar apomixia a partir de isoenzimas em duas espécies arbóreas tropicais *Cavanillesia platanifolia* e *Quararibea asterolepis*, mas o teste de χ^2 rejeitou a hipótese de agamosperma. Murawski & Hamrick (1992) testaram a hipótese de reprodução apomítica em *Ceiba pentandra*, não encontrando evidências pela distribuição de χ^2 . Murawski et al. (1994) testaram apomixia em *Shorea congestiflora* e *S. trapezifolia*, não encontrando evidências estatísticas para tal forma de reprodução. Detectar apomixia espontânea em uma espécie, a partir de isoenzimas, pode exigir em alguns casos uma amostragem específica, devido à necessidade da análise de um grande número de locos

polimórficos e/ou indivíduos por famílias. A amostragem para esse estudo deve incluir um grande número de frutos por matrizes e, dependendo da quantidade de sementes produzidas por fruto, de muitas sementes por frutos. Tendo em vista que muitas vezes as isoenzimas revelam baixo polimorfismo e o trabalho dispendioso para submeter muitos indivíduos à eletroforese, possivelmente é mais adequado utilizar um marcador mais polimórfico, como por exemplo, microssatélites, que permitem a obtenção de um grande número de alelos por loco, substituindo em parte a necessidade de muitos indivíduos por família.

No caso da *G. americana*, em que é confirmada a existência de apomixia, a não detecção a partir de isoenzimas pode estar associada à amostragem inadequada para esse tipo de estudo, certamente devido ao pequeno número de plântulas por família (20). Tendo em vista que a espécie produz em média, 389 sementes por fruto, sendo que cada flor possui igual número de óvulos que podem ser fecundados e fertilizados teoricamente por igual número de grãos de pólen, a presença de menor quantidade de pólen pode originar conjuntamente sementes apomíticas e de cruzamentos que, combinadas com a germinação de quase 100% das sementes (Crestana, 1993), exige que a amostragem inclua muitos frutos por matrizes, sementes por fruto (talvez 200 bastassem) e o maior número possível de locos polimórficos. Considerando-se tais exigências, a restrição da amostragem aqui realizada para acessar a apomixia e a confirmação desta forma de reprodução por Crestana (1993), não se descarta a possibilidade de que os 18,4% de autofecundação detectados sejam, em parte, decorrente da agamosperma.

Finalmente, considerando-se que a frequência mínima esperada de descendentes heterozigóticos de mães igualmente heterozigóticas, em um loco dialélico, é 0,5 (1:1), independente do sistema de reprodução (acasalamentos entre aparentados, autofecundação e apomixia), esperar-se-ia no mínimo 50% de heterozigotos em cada família. Como a frequência observada de heterozigotos foi de 36%, isto é, 14% a menos do que a esperada, não se pode atribuir o excesso de homozigotos ao sistema reprodutivo, visto que independe deste. Este resultado possivelmente está associado à presença de seleção para homozigotos na fase plântula. A seleção pode ser decorrente da amostragem inadequada das sementes nos frutos, ou na fase de transplante das mudas do canteiro para o laminado plástico. A amostragem de cada matriz consistiu na coleta de vários frutos,

obtendo-se uma grande quantidade de sementes, as quais foram misturadas e dessas semeadas, em média, 60 sementes. Posteriormente, foram repicadas 30 plântulas do canteiro para o laminado. Possivelmente, em alguma dessas fases, pode ter ocorrido seleção para sementes ou plântulas homozigóticas.

Como a população apresenta uma alta proporção de cruzamentos entre aparentados e tendo em vista que sua origem pode estar associada à existência de estruturação genética espacial, realizou-se a análise de autocorrelação espacial.

4.4. Distribuição Espacial dos Genótipos

A existência de estrutura familiar dentro das populações pode ter efeitos drásticos sobre a distribuição da variabilidade genética, visto que acasalamentos entre aparentados geram endogamia.

Dado que neste estudo foram detectadas fortes evidências de acasalamentos endogâmicos, realizou-se a análise da autocorrelação espacial com o intuito de caracterizar a estruturação genética na população. Como a população se encontrava subdividida, as análises de autocorrelações foram feitas ao nível de SPop's, a partir do índice I de Moran, para três metodologias distintas, a saber, conexão de Gabriel, vizinho mais próximo (Tabela 24) e classes de distâncias (Figura 3 e 4; Anexo 5).

Tabela 24. Coeficientes de autocorrelação espacial (Índice I de Moran) para a conexão de Gabriel (I_{CG}) e vizinho mais próximo (I_{VMP}) para as SPop's de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Loco	Alelo	SPop1		SPop2	
		I_{CG}	I_{VMP}	I_{CG}	I_{VMP}
6Pgdh-1	1	0,067	0,046	0,143	0,144
	2	-0,219	-0,224	0,164	0,196
Pgi-2	1	-0,334	-0,026	-0,113	-0,148
Mdh-1	1	-0,167	0,000	0,221	0,522 **
Mdh-2	1	-0,167	-0,038	-0,129	-0,285
N° de comparações		18	12	35	17
Distância média (m)		14,0 ± 1,61	11,6 ± 1,35	21,2 ± 2,25	9,3 ± 0,46

*** $P \leq 2,58 = 0,01$. Os testes para verificar se os índices I de Moran diferiam de zero foram realizados pelo teste $Z = (I - 0) / \hat{\sigma}_I$, onde: I = índice de Moran e $\hat{\sigma}_I$ = desvio padrão médio de I.

Como podemos observar, na Tabela 24, dos cinco alelos avaliados pelo índice I para a SPop1, a partir da conexão de Gabriel, quatro foram negativos e um positivo. Para o vizinho mais próximo, três foram negativos e dois positivos. Na SPop2, o I para a conexão de Gabriel e vizinho mais próximo, foram negativo para dois alelos e positivo para os outros três. Porém, apenas o alelo 1 do loco Mdh-1, na SPop2, para o vizinho mais próximo, foi estatisticamente significativo, revelando uma fraca estruturação familiar, possibilitando pressupor que os genótipos se encontram distribuídos aleatoriamente dentro da população.

Nas Figuras 3 e 4 podemos observar claramente que os valores do índice I de Moran, por classe de distância, para todos os alelos, nas duas SPop's, oscilaram de positivos a negativos, flutuando sempre em torno do valor zero. Contudo, apenas dois valores foram significativamente diferentes de zero (ver Anexo 5), e como são negativos, indicam que os indivíduos pareados são completamente diferentes e que a distribuição dos genótipos na população é aleatória. Esse comportamento fica mais claramente explícito nos correlogramas, representando a média entre os alelos, nos quatro locos em que os valores, por classe de distância, flutuam mais próximos ao valor zero reforçando a idéia da distribuição espacial aleatória dos genótipos.

Em vista disso, podemos afirmar que a população não se mostra estruturada, isto é, não há formação de estrutura familiar. Porém, como é observado na Tabela 24, para o vizinho mais próximo, dos 5 alelos avaliados, apenas um revelou a formação de estrutura, o que representa 1/5 dos alelos amostrados, assim, não é possível desconsiderar que existam alguns indivíduos próximos, relacionados geneticamente, responsáveis por alguns cruzamentos endogâmicos, expressos pelas diferenças entre a taxa de cruzamento multilocos e uniloco e pela endogamia encontrada na população.

É importante ressaltar que a inexistência de estruturação familiar não significa que não existam indivíduos aparentados na população; o que acontece, é que estes não se encontram localizados proximamente, porém, caso o fluxo gênico entre as SPop's seja intenso, podem ocorrer facilmente acasalamentos endogâmicos. Mais ainda, a não detecção da estruturação pode estar associada à amostragem deficiente dos indivíduos masculinos, fornecedores de pólen que deram origem as plântulas. Como a espécie é

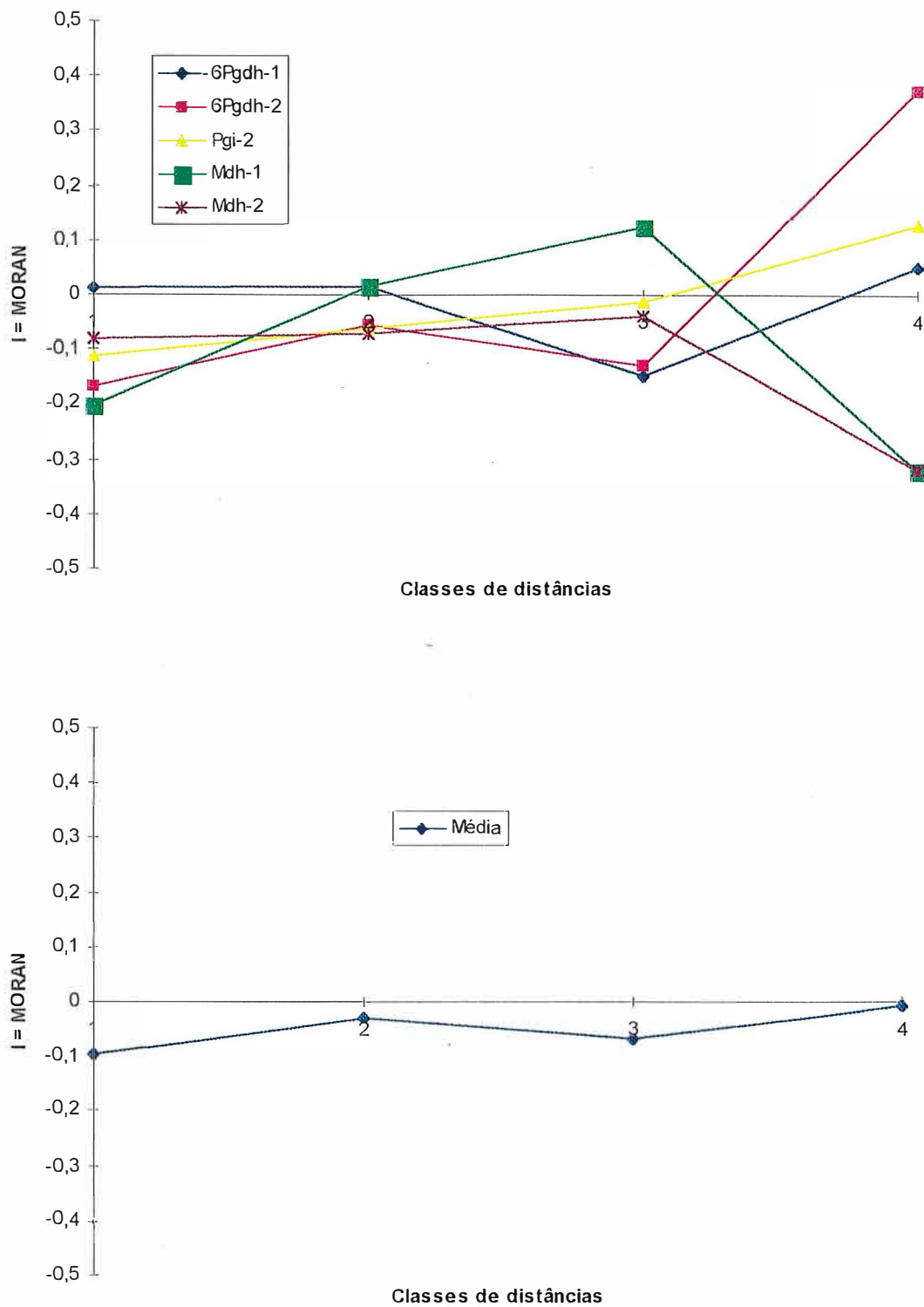


Figura 3. Correlograma de 5 alelos, em 4 locos, e para a média dos alelos, em quatro classes de distâncias, na SPopI de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

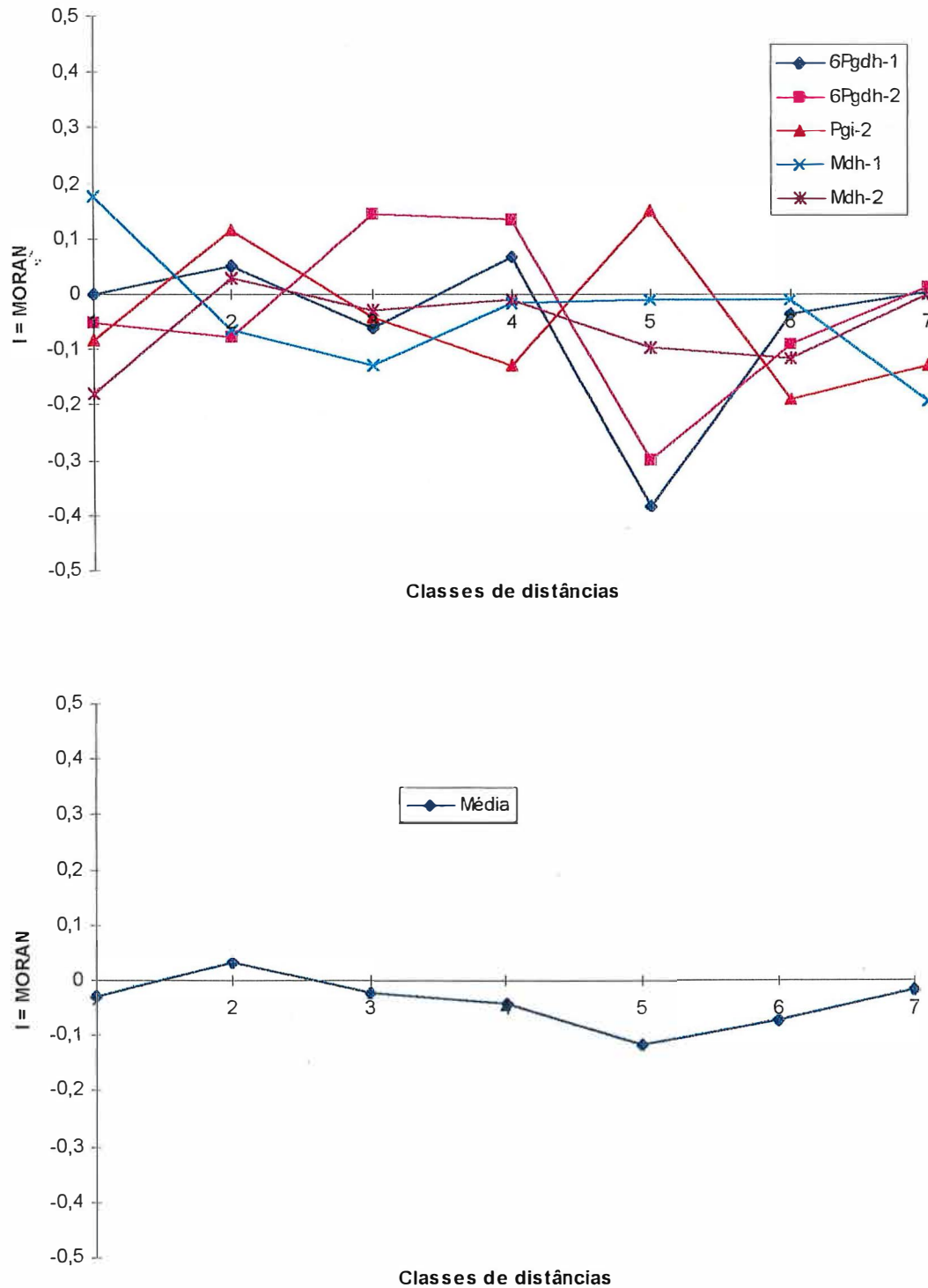


Figura 4. Correlograma de 5 alelos, em 4 locos, e para a média dos locos, em sete classes de distâncias, na SPop2 de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

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 amostrados.

Outra causa para a falta de estrutura, segundo Gandara (1996), é a existência de seleção e/ou deriva genética, agindo como barreira para a sua formação devido à presença de fluxo gênico.

Com o propósito de testar a hipótese de intensa troca gênica entre SPop's, atuando contra a formação de estruturação, mas, permitindo o cruzamento entre aparentados, procedeu-se à estimativa do fluxo gênico.

4.5. Fluxo Gênico Entre SPop's (\hat{N}_m)

A estimativa do fluxo gênico (Tabela 25) foi realizada a partir da relação da divergência genética entre SPop's e a quantidade de migrantes (\hat{N}_m). Para estimativa do fluxo gênico utilizou-se o coeficiente de coancestralidade de Cockerham ($\hat{\theta}_p$), como medida de divergência genética entre SPop's, obtido a partir da análise de variância das frequências alélicas, conforme sugere Cockerham & Weir (1993), em substituição a \hat{F}_{ST} . Só foi possível estimar o fluxo gênico na fase adultas das plantas, devido ao $\hat{\theta}_p$ se apresentar negativo para as plântulas. Cabe frisar que, como se trata de estimativa do fluxo gênico entre SPop's, e estas são subunidades de uma mesma população, o estudo corresponde ao da troca gênica dentro da população.

Tabela 25. Estimativas do fluxo gênico (\hat{N}_m), tamanho da vizinhança (\hat{N}_b) e área da vizinhança (\hat{A}_v), entre SPop's de indivíduos adultos de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Geração	Estimador	\hat{N}_m	\hat{N}_b	\hat{A}_v (m ²) *
Adultos	$\hat{\theta}_p = 0,006$	41,42	260,23	4,501,98

* considerou-se 17,3 a densidade média de indivíduos reprodutivos por hectare.

O fluxo gênico estimado na fase adulta das plantas foi alto (41,42), sugerindo intensa troca gênica entre SPop's. O valor de \hat{N}_m está associado à baixa magnitude do estimador de divergência genética entre SPop's, que, por sua vez, está associado a fatores demográficos como curta distância entre SPop's e ecológicos como polinização entomofílica e dioícia.

O tamanho médio da vizinhança ficou em torno de 260 indivíduos e a área de vizinhança em torno de 0,45 hectare. O resultado sugere que a unidade panmítica ou o número de indivíduos que trocam genes aleatoriamente é o dobro do número total de indivíduos levantados por Crestana (1993) na população (125). Segundo Reis (1996), numa mesma unidade de área, um número menor de indivíduos do que o encontrado para \hat{N}_b , implicará em um aumento da divergência entre as vizinhanças, em decorrência do aumento interno dos níveis de endogamia. Como foi explanado, o número total de indivíduos adultos na população é menor que \hat{N}_b , denotando a possibilidade da ocorrência de alteração na estrutura genética das SPop's, a médio prazo. Outra drástica mudança esperada é a perda de alelos de baixa frequência, como consequência da deriva genética. Além disso, os níveis de heterozigosidade tendem a diminuir, reduzindo a variabilidade genética, e portanto o potencial dinâmico da população.

Quanto à área de vizinhança, o resultado indica que seria necessário um número bem maior de indivíduos reprodutivos, por hectare, para manter a estrutura genética da SPop's.

Finalmente, o alto valor de troca gênica já era esperado, visto que populações localizadas a curtas distâncias, polinizadas por insetos e dispersas pela hidrocoria e mamíferos, tendem a apresentar valores altos de \hat{N}_m , desde que não existam fortes barreiras geográficas.

4.6. Tamanho Efetivo Populacional (\hat{N}_e)

O tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e) é um parâmetro muito importante a ser conhecido nas atividades de preservação de germoplasmas, coleta de sementes e conservação *in situ*, uma vez que trata da representatividade genética das amostras.

Segundo Vencovsky (1987), nas atividades de coleta de sementes de plantas alógamas, sua importância é tal que não é suficiente coletar centenas ou até milhares de sementes de apenas uma única planta, porque elas não valerão mais do que quatro sementes colhidas de quatro plantas. Por conseguinte, para esta atividade, o conhecimento do \hat{N}_e é fundamental para delinear as estratégias ótimas de coleta.

As estimativas do \hat{N}_e , para adultos e progênies, foram obtidas da análise de variância, desconsiderando o nível hierárquico de SPop's, visto que a análise da estrutura das SPop's mostrou serem unidades de uma mesma população, portanto, os dados foram submetidos a uma nova análise de variância, agora sem o nível hierárquico de SPop's (Anexo 3).

A partir da estimativa de \hat{N}_e (Tabela 26), para plantas adultas, pode-se afirmar que os 42 indivíduos (N) analisados representam geneticamente à 49,02 plantas de uma população panmítica ideal. A superioridade de \hat{N}_e sobre N é coerente com os índices de fixação negativos detectados, ou seja, não há endogamia nas plantas adultas. Esta superioridade decorreu da alta heterozigosidade detectada nesta geração. Como os heterozigotos carregam sempre dois alelos diferentes, eles podem representar um número maior de indivíduos na população.

Para as plântulas encontrou-se um \hat{N}_e muito próximo ao dos adultos. Esta estimativa mostra que as 296 plântulas validadas correspondem à 42,92 indivíduos de uma população panmítica ideal. Para essa estimativa não foi possível separar os sexos das plântulas sendo seu cálculo realizada através da metodologia proposta por Vencovsky (1992), para plantas monóicas. Porém, esta não é a forma mais ideal de estimar \hat{N}_e , mas serve como um bom indicativo deste parâmetro. Em simulação, da estimativa de \hat{N}_e , para os adultos de *G. americana*, a partir da metodologia desenvolvida para espécies monóicas, obteve-se um valor subestimado do parâmetro. Assim, se supõe que o \hat{N}_e , para as plântulas, sofra o mesmo efeito; subestimado seu valor real.

Tabela 26. Componentes de variâncias a nível de média de locos para adultos e plântulas, e \hat{N}_e e $\hat{N}_{e/matriz}$. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Adultos			Plântulas				
	A	B	C		A	B	C
$\hat{\sigma}_r^2$	-0,0106	m = 42	-0,0009	$\hat{\sigma}_F^2$	0,0199	rm = 15	0,0013
$\hat{\sigma}_{\sigma(U)}^2$	0,1733	2m = 84	0,0045	$\hat{\sigma}_{r(F)}^2$	0,0189	rmn = 296	0,0001
$\hat{\sigma}_r^2$	0,1628	-----	-----	$\hat{\sigma}_{\sigma(U,F)}^2$	0,0944	2rmn = 592	0,0002
		-----	-----	$\hat{\sigma}_r^2$	0,1333	-----	0,0016
\hat{N}_e			49,02 ¹	\hat{N}_e			42,94
				$\hat{N}_{e/matriz}$			2,86

A: Estimativa de componentes de variância; B: r = número de SPop's, n = número de indivíduos; m = número de famílias; C = A/B = variância média de cada componente; 1: Média ponderada entre sexos

O $\hat{N}_{e/matriz}$ foi médio, 2,86 (42,92/15). Este valor médio decorre do tamanho finito da prole de cada matriz, 20 plântulas. O valor máximo assumido por $\hat{N}_{e/matriz}$ para amostras de tamanho infinito, ou na ordem das centenas, de espécies alógamas, é 4F, onde F é o número de matrizes, assim, $\hat{N}_{e/matriz}$ poderia atingir o valor 4. Por sua vez, o \hat{N}_e poderia atingir o valor máximo de 60 (4x15). O \hat{N}_e obtido foi de 42,92 corresponde à 71,53% do máximo, podendo ser considerado como bom, porém, revelando a existência de homozigose nas plântulas, em concordância aos índices de fixação de Wright.

A estimativa de \hat{N}_e , a partir de dados de isoenzimas, é muito recente e não existem artigos que utilizaram tal metodologia. Este fato dificulta a o trabalho de comparação. Por isso, estimou-se o \hat{N}_e para o estudo realizado por Paiva (1992) com *Hevea brasiliensis*, Moraes (1993) com *M. urundeuva* e Reis (1996) com *E. edulis*. Os autores estudaram populações arbóreas tropicais através de análise de variância de frequências alélicas, permitindo, desta forma, as estimativas dos componentes de variância (Anexo 4) e \hat{N}_e (Tabela 27).

Comparando-se o $\hat{N}_{e/matriz}$ obtido para plântulas de *G. americana* com os de *H. brasiliensis* e *E. edulis*, observam-se valores muito similares; já, com *M. urundeuva*, têm-se uma clara superioridade para os valores aqui encontrados. O $\hat{N}_{e/matriz}$

de *M. urundeuva* foi muito abaixo, relativamente ao encontrado para as outras espécies, em função da existência de um grande número de acasalamentos endogâmicos e/ou preferenciais, o que está bem explícito na magnitude do \hat{f} obtido (0,495) pelo autor. É interessante ressaltar que os indivíduos adultos de *E. edulis*, igualmente aos adultos de *G. americana*, apresentaram valores de \hat{N}_e (205) superiores ao número de indivíduos originalmente avaliados (198), devido à existência de muitos indivíduos heterozigóticos nas populações. A inclusão de heterozigotos na amostragem sempre é uma atitude saudável, visto que, como já discutido anteriormente, os heterozigotos sempre carregam dois alelos diferentes. Supostamente, a grande extensão da amostragem feita por Reis permitiu a inclusão de uma grande heterozigosidade, devido a representar diversas regiões, locais dentro de regiões e populações dentro de locais, dentro de regiões.

Tabela 27. Índice de fixação de Wright (\hat{f}), tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e) e tamanho efetivo populacional por matriz ($\hat{N}_{e/matriz}$), para algumas espécies arbóreas tropicais. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	Plântulas			Adultos
	<i>H. brasiliensis</i> ¹	<i>M. urundeuva</i> ²	<i>E. edulis</i> ³	<i>E. edulis</i> ³
\hat{f}	0,212	0,495	0,062	-0,007
N	937	933	1864	198
\hat{N}_e	120,80	16,72	226,32	205,00
$\hat{N}_{e/matriz}$	2,36	0,33	2,11	----

Estimado a partir dos componentes da variância de 1: Paiva (1992); 2: Moraes (1993); 3: Reis (1996).

A estimativa do \hat{N}_e permite delinear as melhores estratégias para a coleta de sementes. Para esta atividade, deve-se procurar otimizar estimativa de \hat{N}_e , ou seja, obter a melhor representatividade genética possível da população de interesse. Assim, é necessário que se minimizem os componentes médios da variância, que por sua vez, reduzirão a variância média total ($\hat{\sigma}_T^2$) e maximizaram a estimativa de \hat{N}_e , dado que, $\hat{N}_e = (\bar{p}(1-\bar{p}))/\hat{\sigma}_T^2$. Como os componentes da variância, são teoricamente parâmetros populacionais, portanto fixos, para uma população estável, a forma de reduzir suas contribuições na variância média total, é manipulando a intensidade amostral nos diversos

níveis hierárquicos (indivíduos, famílias e populações). Desta forma, aumentando-se a intensidade amostral dos componentes que mais contribuíram para a variância total, reduzir-se-ão suas contribuições ao componente médio, maximizando a estimativa de \hat{N}_e . Por conseguinte, a melhor estratégia de amostragem para os adultos de *G. americana*, é reduzir os componentes médios (coluna C) que mais contribuíram para a variância total. No caso, corresponde a variância dos genes dentro dos indivíduos ($\hat{\sigma}_{\sigma(I)}^2$), portanto, se deve amostrar um número maior de plantas adultas (masculinas e femininas). Para as plântulas, o componente médio de variância que mais contribuiu para a variância total foi entre famílias ($\hat{\sigma}_F^2$), definindo que a melhor estratégia para amostragem é através da colheita de sementes de um número maior de famílias dentro da população. Vencovsky (1987) sugere, para aumentar o \hat{N}_e , tanto para a coleta de sementes como para a preservação de germoplasmas, que se processe o controle gamético feminino através da colheita de um número igual de sementes de cada planta. Esta prática resulta em um tamanho efetivo maior, uma vez que todas as plantas contribuirão com número igual de gametas femininos, não havendo risco de umas contribuírem com mais ou menos sementes, como ocorre quando essas são tomadas ao acaso. Tal prática reduz o efeito da deriva genética ou, em termos quantitativos, reduz a variância do número de gametas fornecidos pelas plantas genitoras, aumentando o \hat{N}_e ou, em outros termos, a representatividade genética do material. Nessa técnica de coleta de campo, o tamanho efetivo máximo atingível é de $4M$, sendo M o número de plantas genitoras. Ainda segundo o autor, o que se deve tomar aleatoriamente é o conjunto de plantas genitoras e não suas sementes. Logo, na atividade de coleta de sementes, o ideal é que se procure sempre reunir descendentes, como sementes, de um maior número possível de plantas genitoras, e de preferência um número igual, ou aproximadamente igual de sementes, de cada uma. Para a *G. americana* o ideal para a atividade de coleta de sementes, é que estas sejam coletadas em quantidade igual ou parecida por matriz, em um número maior de matrizes, aleatoriamente, na população. Esta estratégia garantiria a integridade genética das sementes. Para complementar, possivelmente, caso esta amostragem seja ampliada, incluindo outras populações que apresentem níveis bons de heterozigiosidade e baixa endogamia, é esperado que a integridade genética das sementes seja ainda maior. A

recuperação de áreas degradadas com sementes coletadas a partir destes princípios dará origem a populações com alto potencial evolutivo, dada a possibilidade de infinitas novas recombinações genotípicas que, por sua vez, aumentarão a adaptabilidade da espécie ao ambiente, a possíveis mudanças ambientais futuras e à colonização de novas áreas.

A análise da diversidade genética revelou a população como potencial para a conservação *in situ* dada a heterozigosidade observada, à baixa endogamia nos adultos e a seleção para heterozigotos da fase de plântula para a fase adulta. Para obter-se a área mínima viável para a conservação *in situ*, tomando-se como 50 o número mínimo de indivíduos para esta prática (Frankel & Suolé, 1981) e sendo a relação \hat{N}_e/N da população igual a 1,17 (49,02/42) e o número médio de plantas por hectare de 17,3, supõe-se que esta poderá ser conservada dentro de uma área de 2,45 ha [$50/(17,3 \times 1,17)$], sem que ocorra o perigo da perda de alelos raros a curto prazo. Entretanto, Frankel & Soule (1981) sugerem 500 ou mais indivíduos para a conservação de uma população ideal (com cruzamentos aleatórios, igual proporções de indivíduos de ambos os sexos, sem flutuações na população, sem sobreposição de gerações e distribuição aleatória das progênes das famílias). Neste caso, a área requerida para a conservação da *G. americana* seria de 24,76 ha, podendo ser considerada uma mata pequena. Tal resultado decorre da alta densidade de indivíduos na população e mostra que, para o caso da conservação de ecossistemas florestais, o ideal é que a estimativa da área mínima viável seja realizada a partir das espécies raras [menos de 4 indivíduos por hectare (Hamrick & Murawski, 1991)], visto que estas requerem muito mais espaço para sua manutenção. Utilizando-se espécies raras na determinação da área mínima viável para a conservação, um grande número de espécies comuns, como a *G. americana*, serão preservadas indiretamente, visto que estas requerem menos área para sua manutenção. Do ponto de vista prático, como a área ocupada pela mata em questão é de apenas 7,2 ha, e portanto existe um *déficit* de 17,56 ha, há a necessidade da conservação de outras populações próximas, que permitam o fluxo gênico, mantendo-as geneticamente viáveis. Na falta dessas, a estratégia a ser adotada é a recomposição das matas ciliares próximas com indivíduos oriundos de populações distantes.

5. CONCLUSÕES

O estudo das subpopulações de *G. americana*, a partir de dados de isoenzimas, possibilitou as conclusões que abaixo se arrolam.

Em primeiro lugar, tenha-se presente que a variabilidade genética se encontra quase totalmente distribuída dentro das subpopulações e apenas pequena parte dela se encontra entre as subpopulações, conseqüentemente, ambas constituem subunidades de uma mesma população.

Em segundo lugar, os adultos evidenciaram níveis relativamente altos de heterozigosidade (\hat{H}_o) para a população, se comparados à média de outras espécies arbóreas tropicais estudadas, muito embora as plântulas tenham evidenciados níveis baixo. A alta heterozigosidade é de valor relevante, visto que permitem novas recombinações genotípicas e, por tais razões, a plasticidade adaptativa da espécie às futuras mudanças ambientais e à colonização de novas áreas. Entretanto, a baixa heterozigosidade nas plântulas, evidencia a existência de acasalamentos endogâmicos, refletidos nos altos índices de fixação (\hat{f} e \hat{F}) e pelas diferenças nas taxas de cruzamento multilocos e unilocos ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$). Os altos níveis de heterozigosidade nos adultos, combinada com a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém gerando plântulas fora do equilíbrio e com altos níveis de endogamia, sugere 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 não endogâmicos e endogâmicos. Assinala-se, ainda, que esse estudo não mostrou evidências estatisticamente significativas que permitam afirmar que a espécie apresente apomixia, entretanto, detectou-se um

excesso significativo de descendentes homozigóticas de mãe heterozigóticas, sugerindo a presença de seleção.

A análise da distribuição espacial dos genótipos não revelou estruturação genética na população, dando a entender que os indivíduos se encontram aleatoriamente distribuídos. Todavia, foi encontrado um intenso fluxo gênico entre as subpopulações na fase adulta das plantas, o que tende a homogeneizar a variabilidade genética, reduzir efeitos de deriva e possibilitar o acasalamento entre indivíduos aparentados, porém, localizados a grande distâncias.

Finalmente, a análise do tamanho efetivo populacional apontou que para a colheita de sementes, a melhor estratégia é através da coleta de sementes em um número maior de matrizes, tomadas aleatoriamente dentro da populações. Esta estimativa também mostrou que a área mínima viável para conservação *in situ* de uma população ideal é de 24,76 ha.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, S.A. **Eletroforese de Proteínas e Enzimas: Princípios Básicos e Aplicações**. Apostila do Seminário Sobre Propagação de Essências Florestais. Viçosa, UFV, MG. 1986. 6 p.
- ALFENAS, S.A.; PETERS, I.P.; BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. **Eletroforese de Proteínas e Fungos em Essências Florestais**. Viçosa, UFV, MG. 1981. 242 p.
- ALLARD, R.W. **Princípios do Melhoramento Genético das Plantas**. (Ed) Edgard BLUCHER LTDA. 1971. 381 p.
- ALMEIDA, A.C.; NASSUR, C.A.; FONSECA, S. & PACCAGNELLA, S.G. Aplicação de Técnicas Alternativas na Recuperação de Área Degradada: Estudo de Caso na Aracruz Celulose. **Simpósio Nacional Sobre Recuperação de Áreas Degradadas**. 1994. 1:473-486.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R. & GARAY, A.A. Population Genetic Structure of *Cecropia obtusifolia*, a Tropical Pioneer Species. **Evolution**, **48**(2):437-453, 1994.
- ANDERSON, R.L. & BANCROFT, T.A. **Statistical Theory in Research**. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York. 1952. 399 p.
- BARBOSA, L.M.; BARBOSA, J.M.; BATISTA, E.M.; MANTOVANI, W.; VERONESE, S.A. & JR. ANDREANI, R. Ensaio para Estabelecimento de Modelos para Recuperação de Áreas Degradadas de Matas Ciliares, Mojiguaçu, SP, (Nota Prévia). *In*: SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR. Campinas, SP, FUNDAÇÃO CARGILL. p. 268-83. 1989.
- BAWA, K.S. & O'MALLEY, D.M. Estudios Genéticos y de Sistemas de Cruzamiento en Algunas Especies Arbóreas de Bosques Tropicales. **Revista de Biología Tropical**, **35**(Supl. 1):177-188. 1987.

- BAWA, K.S. Breeding Systems of Tree Species For a Lowland Tropical Community. **Evolution**, **28**: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 Botanic**. **72** (3): 331-45. 1985.
- BERTONI, J.E.A. & MARTINS, F.R. Composição Florística de Uma Floresta Ripária na Reserva Estadual de Porto Ferreira, SP. **Acta Botânica Brasileira**. **1**(1):17-26. 1987.
- BROWN, A.H.D. Enzyme Polymorphism in Plant Populations. **Theor. Popul. Biol.** **15**:1-42. 1979.
- BROWN, A.H.D., BARRET, S.C.H. & MORAN, G.F. Mating System Estimation in Forest Trees: Models, Methods and Meanings. In: GREGORIUS, H.R. Ed. **Population Genetics in Forestry**, Springer-Verlag, Berlin. 1984. p. 32-49.
- BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. & JAROSZ, A.M. Isozyme Analysis of Plant Mating Systems. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. (ed.). **Isozymes in Plant Biology**. Portland, Dioscorides Press. 1989. p.73-86.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso de Madeira**. EMBRAPA-CNPQ, Brasília. 1994. 640 p.
- CHELIAK, W.M. & PITTEL, J.A. Techniques For Starch Gel Electrophoresis of Enzymes From Forest Tree Species. **Information Report Pi - X**, Chalk River. 1984. (42):1-49.
- CLEGG, M. T. Measuring Plant Mating Systems. **Bioscience**, **30**(12):814-18. 1980.
- CLEGG, M.T., KAHLER, A.L. & ALLARD, R.W. Estimation of Life Cycle Components of Selection in a Experimental Plant Population. **Genetics**, **89**: 765-92. 1978.
- COCKERHAM, C.C. & WEIR, B.S. Estimation of Gene Flow From F-Statistics. **Evolution**, **47**(3):855-63. 1993.
- COCKERHAM, C.C. Variance of Gene Frequencies. **Evolution**, **23**:72-84. 1969.
- CONKLE, M.T.; HODGSKISS, P.D.; NUNNALLY, L.B. & HUNTER, S.C. Starch Gel Electrophoresis of Conifer Seeds: a Laboratory Manual. **USDA. Forest Service PSW General Technical Report**, Berkeley (64), p.1-18. 1982.
- CORDER; M.R.M. & LOPES, C.R. Análise Genética de Padrões Isoenzimáticos de *Eucalyptus spp.* em Diferentes Estágios de Desenvolvimento. In: **Anais do 1º Congresso Florestal Panamericano e 7º Congresso Florestal Brasileiro**. Curitiba - PR. 1993. (1): 82-84.

- CRESTANA, C. de S.M. **Biologia Reprodutiva de *Genipa americana* L. (RUBIACEAE) na Estação Ecológica de Mojiguaçu, Estado de São Paulo.** UNESP, Rio Claro, 1993. 222 pag. Tese (Doutorado) - Univerdidade Estadual de Rio Claro.
- CROW, J.F. & KIMURA, M. A. **An Introduction to Population Genetics Theory.** HARPER & ROW, PUBLISHERS. 1970. 591 p.
- DEMATTÊ, M.E.S.P. Recomposição de Matas Ciliares na Região de Jaboticabal, SP. *In: Anais do Simpósio de Matas Ciliares.* FUNDAÇÃO CARGILL, Campinas, SP. p.160-70. 1989.
- DEWEY, S.E. & HEYWOOD, J.S. Spatial Genetic Structure in a Population of *Psychotria nervosa*. I. Distribution of Genotypes. **Evolution**, **42**:834-838. 1988.
- DIAS, L.A. dos S. & KAGEYAMA, P.Y. Variação Genética em Espécies Arbóreas e Conseqüências para o Melhoramento Florestal. **Agrotropica**, **3**(3):119-27. 1991.
- DURIGAN, G. & NOGUEIRA, J.C.B. Recomposição de Matas Ciliares. **Série Registros.** IF de São Paulo. (4): 1-14. 1990.
- EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, N. & PIÑERO, D. Genetic Structure, Outcrossing Rate and Heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (Tropical Palm): Implications for Evolution and Conservation. **Heredity**, **69**:217-228. 1992.
- EL-KASSABY, Y.A. & RITLAND, K. Low Levels of Pollen Contamination in a Douglas-fir Seed Orchard as Detected by Allozyme Markers. **Silvae Genetic.** **35**:224-9. 1987.
- EPPERSON, B.K. Spatial Patterns of Genetic Variation Within Plant Populations. *In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. e Weir, B.S. (eds) Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources.* Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 1990. p.229-253.
- ESCALANTE, A.M.; COELLO, G.; EGUIARTE, L.E. & PIÑERO, D. Genetic Structure and Mating Systems in Wild and Cultivated Populations of *Phaseolus coccineus* and *P. vulgaris* (Fabaceae). **American Journal of Botany.** **81**(9):1096-1103. 1994.
- FRANKEL, O.H., & SOULÉ, M.S. **Conservation and Evolution.** Cambridge University Press. Cambridge. 1981. 327 p.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva.** Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 631 p.
- GANDARA, F.B. **Diversidade Genética, Taxa de Cruzamento e Estrutura Espacial dos Genótipos em Uma População de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae).** Campinas, 1996, 69 p. Tese (Mestrado) - UNICAMP.

- GIBBS, P.E. & LEITÃO FILHO, H. de F. Composição Florística de Uma Área de Mata Ciliar nas Proximidades de Mojiguaçu, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. 1(1):151-6. 1978.
- GIBBS, P.E.; LEITÃO FILHO, H. de F. & ABBOTT, R.J. Aplicação do Método dos Quadrantes no Levantamento Florístico de Uma Mata Ciliar em Mojiguaçu, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. 3:17-22. 1980.
- GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. Piracicaba, USP/ESALQ, 13^a. ed. 1990. 354 p.
- HAMRICK, J.L. & GODT, M.J.W. Allozyme Diversity in Plant Species. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. e Weir, B.S. (eds) **Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 1990. p.43-63.
- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. Isozyme Variation in Tropical Trees: Procedures and Preliminary Results. **Biotropica**, 18:201-207. 1986a.
- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. The Genetic Structure of Tropical Tree Populations: Association With Reproductive Biology. In: BOCK, J.H. & LINHART, Y.B. eds. **The Evolutionary Ecology of Plants**. Westview Press, Boulder, CO, USA. 1989. 129-146 p.
- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. The Influence of Seed Dispersal Mechanisms on the Genetic Structure of Plant Populations. In: ESTRADA, A. & FLEMING, T.H. (eds.) **Frugivores and Seed Dispersal**. Junk Publishers, 1986b. Cap. 17, 392 p.
- HAMRICK, J.L. & MURAWSKI, D.A. Levels of Allozyme Diversity in Populations of Uncommon Neotropical Tree Species. **Journal of Tropical Ecology**, 7:395-399. 1991.
- HAMRICK, J.L. & MURAWSKI, D.A. The Breeding Structure of Tropical Tree Populations. **Plant Species Biology**, 5:157-165. 1990.
- HAMRICK, J.L. Gene Flow and Distribution of Genetic Variation in Plant Populations. In: Differentiation Patterns in Higher Plants. **Copyright by Academic Press**. p. 53-67. 1987.
- HAMRICK, J.L. 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. 1989. p. 87-105.
- HAMRICK, J.L. The Distribution of Genetic Variation Within and Among Natural Plant Population. In: C.M. SCHONE-WALD-COX, S.H. CHAMBERS, B. MacBYDE, & L. THOMAS. **Genetics and Conservation**. Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, California. 1983. p. 335-348.

- 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**, **10**:173-200. 1979.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D.A. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. **North-Holland Publ. Co.**, Amsterdam, 1976. 17 p.
- HILL, R. J.; PRANCE, G. T.; MORI, S. A.; STEWARD, W. C.; SHIMABUKURU, D. & BERNARDI, J. Estudo Eletroforético da Dinâmica de Variação Genética em Três Taxa Ribeirinhas ao Longo do Rio Solimões, América do Sul. **Acta Amazônica**. **8**(2):183-199. 1978.
- KAGEYAMA, P.Y. & DIAS, I. de S. Aplicação da Genética em Espécies Florestais Nativas. *In*: Congresso Nacional Sobre Essências Nativas. Anais. Campos do Jordão, SP, 12 a 18 de setembro de 1982. **Silvicultura em São Paulo**, Vol. 16A, São Paulo, Edição Especial, 1982. p. 782-791.
- KAGEYAMA, P.Y. Conservação *In Situ* de Recursos Genéticos de Plantas. **IPEF**. Piracicaba. (35):7-37. 1987.
- KAGEYAMA, P.Y.; SANTARELLI, E.; GANDARA, F.B.; GONÇALVES, J.C.; SIMIONATO, J.L.; ANTIQUEIRA, L.R. & GERES, W.L. Revegetação de Áreas Degradadas: Modelos de Consorciação com Alta Diversidade. **Recuperação de Áreas Degradadas**. **11**: 569-575. 1994.
- KAUR, A.; HA, C.O.; JOHG, K.; SANDS, H.T.; SOLPADMO & ASHTON, P.S. Apomixis May be Widespread Among Tree of the Climax Rain Forest. **Nature**, **271**:440-2. 1978.
- KEPHART, S.R. Starch Gel Electrophoresis of Plant Isozymes: A Comparative Analysis of Techniques. **American Journal of Botany**, **77**(5):693-712. 1990.
- 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**. **77**(8):1101-1110. 1990.
- KÖEPPEN, W. **Climatologia**. Editora Fundo de Cultura Econômica, México. 1948. 207 p.
- LEPSCH-CUNHA, N. **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, SP. 1996. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/USP.

- LEVIN, D.A. Pollinator Behavior and the Breeding Estructure of the Plant Populations. In: A.J. RICHARDS (ed.), **The Pollination of Flowers by Insects**, 133-150. Linnean Society Symposium Series. No 6, Academic Press, New York, NY. 1978.
- LI, C.C. & HORVITZ, D.G. Some Methods of Estimating the Inbreeding Coefficient. **American Journal of Human Genetics** **5**: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**. **74**: 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**. **82**(11):1420-1425. 1995.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP. Ed. Plantarum. 1992. p. 302.
- LOVELESS, M. D. & HAMRICK, J.L. Distribucion de la Variacion en Espécies de Arboles Tropicales. **Revista Biologia Tropicales**. **35**(supl. 1):165-75. 1987.
- LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics** **15**:65-95. 1984.
- MANTOVANI, W.; ROSSI, L.; NETO, S.R.; ASSAD-LUDEWIGS, I.Y.; WANDERLEY, M. de G.L.; MELO, M.M. da R. de. & TOLEDO, C.B. de. Estudo Fitossociológico de Áreas de Matas Ciliar em Mojiguaçu, SP, Brasil. In: **Anais do Simpósio Sobre Mata Ciliar. FUNDAÇÃO CARGILL**. 1989. p. 235-67.
- MARSHAL, D.R. & BROWN, A.H.D. The Evolution of Apomixis. **The Genetical Society of Great Britain**. 1981. 15 p.
- MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & LUCCHI, A.E. Adaptações Anatômicas. In: **Anais do Simpósio Sobre Mata Ciliar. Fundação Cargill**.1989. p. 71-87.
- METTER, I.E. & GREGG, T.G. **Genética de Populações e Evolução**. São Paulo, Polígono, Ed. da USP, 1973. 262 p.
- MORAES, M.L.T. **Variabilidade Genéica 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, 1993. 139 p. Tese (Doutorado) - ESALQ/USP.

- MURAWSKI, D.A. & BAWA, K.S. Genetic Structure and Mating System of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **American Journal of Botany**, **81**(2):155-160. 1994.
- MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. Mating System and Phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Panama. **Journal of Heredity**, **83**(6):401-404. 1992b.
- MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. The Effect of the Density of Flowering Individuals on the Mating Systems of Nine Tropical Tree Species. **Heredity**, **67**:167-174. 1991.
- MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. The Mating System of *Cavanillesia platanifolia* Under Extremes of Flowering-Tree Density: a Test of Predictions. **Biotropica**, **24**(1):99-101. 1992a.
- MURAWSKI, D.A. Reproductive Biology and Genetics of Tropical Trees from a Canopy Perspective. In: Lowman, M.D. & Nadkarni, N.M. **Forest Canopies**. Academic Press. pag. 457-493. 1995.
- MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B. & BAWA, K.S. Outcrossing Rates of Two Endemic *Shorea* Species From Sri Lankan Tropical Rain Forest. **Biotropica**, **26**(1): 23-29. 1994.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L.; HUBBELL, S. P. FOSTER, R.B. Mating System of Two Bombacaceous Trees of a Neotropical Moist Forest. **Oecologia**. **82**:501-506. 1990.
- NEI, M. **Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations**. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **70**(12):3321-3. 1973.
- NEI, M. F-Statistic and Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Ann. Human Genetics**, **41**:225-33. 1977.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York, Columbia University Press. 1987. 512 p.
- NILSSON, T.T. Levantamento do Potencial Econômico da Mata Ciliar e Sugestões Quanto ao seu Aproveitamento Racional. In: Anais do Simpósio Sobre Mata Ciliar. **FUNDAÇÃO CARGILL**, Campinas, SP. 1989. p. 144-55.
- NOGUEIRA, J.C.B. Recomposição da Mata Ciliar da Usina Ester em Cosmópolis, Reserva Florestal de Bauru (Instituto Florestal) , Oeste do Estado de São Paulo. In: Anais do Simpósio Sobre Mata Ciliar. **FUNDAÇÃO CARGILL**. 1989. p. 156-9.
- O'MALLEY, D.M. & BAWA, K.S. Mating System of a Tropical Rain Forest Tree Species. **American Journal of botany**. Columbus, **74**(8):1143-1149. 1987.

- PAIVA, J.R. **Variabilidade Enzimática em Populações de Seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. ADR. DE JESS) Müell. Arg.)**. Piracicaba, 1992. 144 p. Tese (Doutorado) - ESALQ/USP.
- PÉREZ-NASSER, N.; EGUIARTE, L.E. & PIÑERO, D. Mating System and Genetic Structure of the Distylous Tropical Tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, **80**(1):45-52. 1993.
- PERRY, D.J. & KNOWLES, P. Spatial Genetic Structure Within Three Sugar Maple (*Acer saccharum* Marsh.) Stands. **Heredity**, **66**:137-142. 1991.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. Edit. Guanabara Dois S. A. Rio de Janeiro - RJ, 1978. 724 p.
- REIS, M.S. **Distribuição e Dinâmica da Variabilidade Genética em Populações Naturais de Palmitreiro (*Euterpe edulis* M.)**. Piracicaba, 1996. 210 p. Tese (Doutorado) - ESALQ/USP.
- RITLAND, K. & EL-KASSABY, Y. A. The Nature of Inbreeding in a Seed Orchard of Douglas Fir as Shown by Efficient Multilocus Model. **Theor. Appl. Genetic**. **71**: p. 375-384. 1985.
- RITLAND, K. & JAIN, S. A Model for the Estimation of Outcrossing Rate and Gene Frequency Using Independent Loci. **Heredity**, **47**:35-52. 1981.
- RITLAND, K. A Series of FORTRAN Computer Programs for Estimating Plant Mating Systems. **Journal of Heredity**, **81**:235-237. 1990.
- RITLAND, K. Estimation of Mating Systems. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds., **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**. Part A. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science Publishers, 1983. p:289-302.
- RITLAND, K. The Effective Proportion of Self-Fertilization with Consanguineous Mating in Inbred Populations. **Genetics**, **106**: 139-152. 1984.
- ROBERDS .J.H. & BROTSCHOL, J.V. Linkage Desiquilibria Among Allozyme Loci in Natural Populations of *Liriodendron tulipifera* L. **Silvae Genetica** **34**, 4-5. 1985.
- RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S. & RIBEIRO, C. A. Revegetação de Áreas Degradadas da Bacia do Ceveiro, Piracicaba, SP. **Simpósio Nacional Sobre Recuperação de Áreas Degradadas**. p. 178-188. 1994a.
- RODRIGUES, R.R.; LEITÃO FILHO, H.F. & CRESTANA, M.S.M. Revegetação do Entorno da Represa de Abastecimento de Água do Município de Iracemópolis, SP. **Simpósio Nacional Sobre Recuperação de Áreas Degradadas**. p. 407-416. 1994b.

- S.A.S. Institute. **SAS STAT. Guide for Personal Computers, Version 6.03**. SAS Institute Inc., Cary, N.C. 1985.
- SCHNABEL, A. & HAMRICK, J.L. Organization of Genetic Diversity Within and Among Populations of *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, **77**:1060-1069. 1990.
- SHAW, D. V. & ALLARD, R. W. Estimation of Outcrossing Rates in Douglas-Fir Using Isozyme Markers. **Theor. Appl. Genetic** **62**:113-120. 1982.
- SOKAL, R.R. & ODEN, N.L. Spatial Autocorrelation in Biology. 2. Some Biological Implications and Four Applications of Evolutionary and Ecological Interest. **Biol. J. Linn. Soc.** **10**: 229-249. 1978b.
- SOKAL, R.R. & ODEN, N.L. Spatial Autocorrelation in Biology. I Methodology. **Biol. J. Linn. Soc.** **10**: 199-228. 1978a.
- SPURR, S.H. & BARNES, B.V. **Ecologia Florestal**. AGT EDITOR, S.A. pag. 12 a 97, 1984.
- STEBBINS, G.L. Introduction. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. (ed.). **Isozymes in Plant Biology**. Portland, **Dioscorides Press**, 1989. p.73-86.
- SWANSON, C.P.; MERZ, T. & YOUNG, W.J. **Citogenética**. São Paulo, Polígono, Editora da Universidade de São Paulo, 1969. 244 p.
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER. **Byosys-1. A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Population Genetics and Biochemical Systematics**. Release 1,7, Illinois Natural History Survey, Illinois. 1989. 43 p.
- TOKUNAGA, T. & OHNISHI, O. Spatial Autocorrelation Analysis of Allozyme Variants Within Local Sites of Wild Radish Population. **Jpn. J. Genetetic**. **67**: 209-217. 1992.
- VENCOVSKY, R. Análise de Variância de Frequências Alélicas. In: **Congresso Latino Americano de Genética, 10^o**, Rio de Janeiro, Proceedings, Revista Brasileira de Genética, 1992. **15** (suplemento 1):53-60.
- VENCOVSKY, R. Estimadores de Diversidade. In: KAGEYAMA, P.Y.; REIS, M.S.; GANDARA, F.B., Coordenadores do Curso: “**Estimação de Variação Genética e Taxa de Cruzamento em Populações de Espécies Arbóreas**”. LCF/ESALQ/USP. Manuscrito não publicado, 1993. 82p.
- VENCOVSKY, R. Tamanho Efetivo Populacional na Coleta e Preservação de Germoplasmas de Espécies Alógamas. **IPEF**, Piracicaba, (35). 1987.

- VENCOVSKY, R. Variance of an Estimate of Outcrossing Rate. **Revista Brasileira de Genética**, **17**(3):349-51. 1994.
- WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. Genetic of Plant Izozymes. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. **Isozymes in Plant Biology**. Chapman and Hall Ltda. 1990. p. 46-67.
- WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis. Methods for Discrete Population Genetic Data**. North Caroline State University, Sinauer Associates Inc. Pub., Suderland, Massachusetts. 377 p. 1991.
- WENDEL, J.F. & WEEDEN, N.F. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. (ed.). **Isozymes in Plant Biology**. Portland, Dioscorides Press, 1989. p.5-45.
- WORKMAN, P. & NISWANDER, J.L. Population Studies on Southwestern Indian Tribes. II. Local Genetic Differentiation in the Papago. **American Journal Human Genetic**, **22**:24-49. 1970.
- WRIGHT, J.A. Conservacion *ex situ* de Especies Nativas en Colombia. Smurfit Cartón de Colombia, **Investigación Forestal** n° 159, 6 p. 1993.
- WRIGHT, S. Evolution and the Genetics Populations. **Ann. Eugen**, **15**: 323-354. 1951.
- WRIGHT, S. The Interpretation of Population Structure by F-statistics With Special Regard to Systems of Mating. **Evolution**. **19**: 395-420. 1965.
- WRITE, M.J.D. **Os Cromossomos**. São Paulo, Ed. Nacional, USP, 1977. 196 p.
- YAMADA, M.M. & GURIES, R.P. **A Manual for Starch Gel Eletrophoresis: New Chocolate Lovers Edition**. Staff Paper Series n.39, Department Forestry of Wisconsin, Madison, 1989. 22 p.
- ZELAZOWSKI, V.H. & LOPES, G.L. Revegetação em Áreas de Embate no Refúgio Biológico de Santa Helena, Itaipu Binacional - Margem Esquerda. **Simpósio Nacional Sobre Recuperação de Áreas Degradadas**. 1994. p. 417-424.

ANEXOS

Anexo 1. Expressões das somas dos quadrados das SPop's, famílias dentro de SPop's, indivíduos dentro de famílias, dentro de SPop's, genes dentro de indivíduos, dentro de famílias, dentro de SPop's, dos coeficientes de K1, K2, K3, f_i , f_{ij} , obtidos da análise de variância no modelo hierárquico desbalanceado, conforme Anderson & Bancroft (1952) e Weir(1990). Piracicaba, ESALQ/USP, SP.

1. Somas de Quadrados

$$\text{a) } C = \frac{Y_{..}^2}{n_{..}}$$

$$\text{b) } SQ_P = \frac{\sum_{i=1}^g Y_{i..}^2}{n_{i..}} - C$$

$$\text{c) } SQ_F = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} Y_{ij..}^2}{n_{ij.}} - \frac{\sum_{i=1}^a Y_{i..}^2}{n_{i..}}$$

$$\text{d) } SQ_I = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} \sum_{k=1}^{c_{ij}} Y_{ijk.}^2}{n_{ijk}} - \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} Y_{ij..}^2}{n_{ij.}}$$

$$\text{e) } SQ = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}^2 - \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} \sum_{k=1}^{c_{ij}} Y_{ij..}^2}{n_{ij.}}$$

$$\text{f) } SQ_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_j} \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}^2 - C$$

sendo:

$n_{ijk} = 2$ (número de genes por indivíduo)

$$n_{ij.} = \sum_{k=1}^{c_{ij}} n_{ijk}$$

$$n_{i.} = \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} n_{ijk}$$

$$n_{..} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} n_{ijk}$$

$$Y_{ijk.} = \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}$$

$$Y_{ij..} = \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}$$

$$Y_{i...} = \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}$$

$$Y_{....} = \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{l=1}^{n_{ijk}} Y_{ijkl}$$

2. Coeficientes

$$a) K1 = \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij.}^2 \cdot f_{ij}$$

$$b) K2 = \sum_{k=1}^{c_{ij}} \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij.}^2 \cdot f_i$$

$$c) K3 = \sum_{k=1}^{c_{ij}} n_{ij.}^2 \cdot f_{i..}$$

onde:

$$f_{ij} = \frac{\frac{1}{n_{ij.}} - \frac{1}{n_{i..}}}{\sum_{i=1}^a \frac{1}{b_j} - a}$$

$$f_{ij} = \frac{\frac{1}{n_{ij.}} - \frac{1}{n_{i..}}}{a - 1}$$

Anexo 2

Tabela 28. Quadrados médios da análise de variância para vários alelos em quatro locos e para a média entre locos em plantas adultas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	6Pgdh-1	6Pgdh-2	6Pgdh-3	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-11	Mdh-12	Mdh-21	Mdh-22	Média
FV	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Subpop.	0,4354	0,0846	0,1362	0,2224	0,2224	0,2381	0,2381	0,0765	0,0765	0,1922
Indivíduo	0,2609	0,2530	0,1822	0,1793	0,1793	0,0750	0,0750	0,0865	0,0865	0,1524
Gene	0,1829	0,2561	0,0732	0,3214	0,3214	0,0952	0,0952	0,1071	0,1071	0,1733

Tabela 29. Quadrados médios da análise de variância para vários alelos em quatro locos e para a média entre locos em plântulas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	6Pgdh-1	6Pgdh-2	6Pgdh-3	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-11	Mdh-12	Mdh-21	Mdh-22	Média
FV	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Subpop.	0,2883	0,0035	0,4388	0,0838	0,0838	0,1023	0,1023	0,0047	0,0047	0,1236
Familia	2,8361	2,3449	0,2170	1,2582	1,2582	0,1585	0,1585	0,0396	0,0396	0,9234
Indivíduo	0,2545	0,2417	0,0598	0,2598	0,2598	0,0190	0,0190	0,0383	0,0383	0,1323
Gene	0,1078	0,1529	0,0451	0,1980	0,1980	0,0273	0,0273	0,0415	0,0415	0,0944

Tabela 30. Componentes de variâncias para vários níveis hierárquicos para cinco alelos em quatro locos e para a média entre locos em plantas adultas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	6Pgdh-1	6Pgdh-2	6Pgdh-3	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-11	Mdh-12	Mdh-21	Mdh-22	Média
σ^2_p	0,0046	-0,0044	-0,0012	0,0011	0,0011	0,0042	0,0042	-0,0003	-0,0003	0,0010
$\sigma^2_{I(P)}$	0,0390	-0,0016	0,0545	-0,0711	-0,0711	-0,0101	-0,0101	-0,0103	-0,0103	-0,0105
$\sigma^2_{G(I(P))}$	0,1829	0,2565	0,0732	0,3214	0,3214	0,0952	0,0952	0,1071	0,1071	0,1733
σ^2_T	0,2265	0,2501	0,1265	0,2515	0,2515	0,0893	0,0893	0,0966	0,0966	0,1639

Tabela 31. Componentes de variâncias para vários níveis hierárquicos para cinco alelos em quatro locos e para a média entre locos em plântulas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	6Pgdh-1	6Pgdh-2	6Pgdh-3	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-11	Mdh-12	Mdh-21	Mdh-22	Média
σ^2_p	-0,0116	-0,0105	0,0009	-0,0044	-0,0044	-0,0003	-0,0003	-0,0001	-0,0001	-0,0032
$\sigma^2_{F(P)}$	0,0765	0,0623	0,0047	0,0251	0,0251	0,0038	0,0038	0,0000	0,0000	0,0215
$\sigma^2_{[F(P)]}$	0,0733	0,0444	0,0074	0,0309	0,0309	-0,0042	-0,0042	-0,0016	-0,0016	0,0190
$\sigma^2_{A([F(P)])}$	0,1078	0,1529	0,0451	0,1980	0,1980	0,0273	0,0273	0,0415	0,0415	0,0944
σ^2_T	0,2461	0,2491	0,0580	0,2496	0,2496	0,0267	0,0267	0,0396	0,0396	0,1317

Anexo 3

Tabela 32. Quadrados médios da análise de variância para vários alelos em quatro locos e para a média entre locos em plantas adultas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	6Pgdh-1	6Pgdh-2	6Pgdh-3	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-11	Mdh-12	Mdh-21	Mdh-22	Média
FV	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Indivíduo	0,2652	0,2488	0,1811	0,1749	0,1749	0,0790	0,0790	0,0862	0,0862	0,1522
Gene	0,1829	0,2561	0,0732	0,3214	0,3214	0,0952	0,0952	0,1071	0,1071	0,1733

Tabela 33. Quadrados médios da análise de variância para vários alelos em quatro locos e para a média entre locos em plântulas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	6Pgdh-1	6Pgdh-2	6Pgdh-3	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-11	Mdh-12	Mdh-21	Mdh-22	Média
FV	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Família	2,6541	2,1777	0,2329	1,1743	1,1743	0,1545	0,1545	0,0371	0,0371	0,8663
Indivíduo	0,2545	0,2417	0,0598	0,2598	0,2598	0,0190	0,0190	0,0383	0,0383	0,1323
Gene	0,1078	0,1529	0,0451	0,1980	0,1980	0,0273	0,0273	0,0415	0,0415	0,0944

Tabela 34. Componentes de variâncias para vários níveis hierárquicos para cinco alelos em quatro locos e para a média entre locos em plantas adultas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	6Pgdh-1	6Pgdh-2	6Pgdh-3	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-11	Mdh-12	Mdh-21	Mdh-22	Média
σ^2_1	0,0412	-0,0037	0,0540	-0,0733	-0,0733	-0,0081	-0,0081	-0,0105	-0,0105	-0,0106
σ^2_{GD}	0,1829	0,2565	0,0732	0,3214	0,3214	0,0952	0,0952	0,1071	0,1071	0,1733
σ^2_T	0,2441	0,2524	0,1271	0,2428	0,2428	0,0871	0,0871	0,0967	0,0967	0,1628

Tabela 35. Componentes de variâncias para vários níveis hierárquicos para cinco alelos em quatro locos e para a média entre locos em plântulas de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	6Pgdh-1	6Pgdh-2	6Pgdh-3	Pgi-1	Pgi-2	Mdh-11	Mdh-12	Mdh-21	Mdh-22	Média
σ^2_F	0,0708	0,0571	0,0051	0,0230	0,0230	0,0037	0,0037	0,0000	0,0000	0,0199
$\sigma^2_{(F)}$	0,0733	0,0444	0,0074	0,0309	0,0309	-0,0042	-0,0042	-0,0016	-0,0016	0,0190
$\sigma^2_{G((F))}$	0,1078	0,1529	0,0451	0,1980	0,1980	0,0273	0,0273	0,0415	0,0415	0,0944
σ^2_T	0,2519	0,2544	0,0244	0,2519	0,2519	0,0268	0,0268	0,0399	0,0399	0,1333

Anexo 4

Tabela 36. Componentes de variâncias e tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e), ao nível de média de locos, para indivíduos adultos e plântulas de *E. edulis* e progênies de *M. urundeuva* e *H. brasiliensis*). Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

	Adultos	Progênies			
	<i>E. edulis</i>	<i>E. edulis</i> ¹	<i>M. urundeuva</i> ²	<i>H. brasiliensis</i> ³	
$\hat{\sigma}_p^2$	0,0001	$\hat{\sigma}_p^2$	0,0005	0,0065	0,0002
$\hat{\sigma}_{I(P)}^2$	-0,0067	$\hat{\sigma}_{I(P)}^2$	0,0146	0,0328	0,0087
$\hat{\sigma}_{G(I(P))}^2$	0,1317	$\hat{\sigma}_{I(P(P))}^2$	-0,0082	0,0298	0,0064
$\hat{\sigma}_T^2$	0,1280	$\hat{\sigma}_{G(I(P(P)))}^2$	0,0976	0,0634	0,0545
		$\hat{\sigma}_T^2$	0,1068	0,1330	0,0698

1: Reis, 1996; 2: Moraes, 1993; 3: Paiva, 1992.

Anexo 5

Tabela 37. Coeficientes de autocorrelação espacial (coeficiente I de Moran), para 4 classes de distância, em 5 alelos de 4 locos isoenzimáticos na SPop1 de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Loco	Alelo	Classe de Distância			
		1	2	3	4
6Pgdh-1	1	0,014	0,017	-0,147	0,052
1	2	-0,166	-0,054	-0,128	0,375
Pgi1-2	1	-0,111	-0,060	-0,140	0,129
Mdh-1	1	-0,203	0,016	0,125	-0,318
Mdh-2	1	-0,008	-0,069	-0,038	-0,266
I Médio		-0,095	-0,030	-0,066	-0,005
Distância média (m) (sd)		20,0 (0,0)	40,0(0,0)	109,9 (1,66)	144,3 (1,01)
Nº de comparações		32	31	24	11

Tabela 38. Coeficiente I de Moran, para 7 classes de distância em 5 alelos de 4 locos isoenzimáticos na SPop2 de *G. americana*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Loco	Alelo	Classe de Distância						
		1	2	3	4	5	6	7
6Pgdh-1	1	-0,001	0,052	-0,061	0,037	-0,381**	-0,036	0,030
1	2	-0,052	-0,076	0,144	0,134	-0,299**	-0,089	0,014
Pgi1-2	1	-0,084	0,115	-0,043	-0,129	0,152	-0,188	-0,129
Mdh-1	1	0,177	-0,063	-0,128	-0,016	-0,100	-0,100	-0,192
Mdh-2	1	-0,181	0,029	-0,030	-0,010	-0,097	-0,114	
I Médio		-0,028	0,033	-0,021	-0,042	-0,114	-0,072	-0,015
Distância média (m) (sd)		15,0 (0,0)	30,0 (0,0)	60,0 (0,0)	90,0 (0,0)	120,0 (0,0)	150,0 (0,0)	180,0 (0,0)
Nº de comparações		65	71	40	64	35	35	39

$P \leq 2,58 = 0,01$. O teste para verificar se os valores de classes de distância diferem de zero, foram realizados pelo teste $z = (I-0)/\hat{\sigma}_I$, onde: I = índice de Moran e $\hat{\sigma}_I$ = desvio padrão de I da média.