

Baixa taxa de contaminação de pólen, desvios de cruzamentos aleatórios e endogamia em um pomar de sementes de *Ilex paraguariensis* L.Low pollen contamination rate, deviations from random matings, and inbreeding in an *Ilex paraguariensis* L. seed orchardSimone Neumann Wendt<sup>1</sup>, Valderês Aparecida de Sousa<sup>2</sup>, Marguerite Quoirin<sup>3</sup>, Maria Cristina Mazza<sup>4</sup>, José Alfredo Sturion<sup>2</sup>, Alexandre Magno Sebbenn<sup>5</sup>**Resumo**

Os níveis de imigração, a distância de dispersão de pólen e o sistema de reprodução foram investigados em um pequeno pomar de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hill. (erva-mate) em Colombo, estado do Paraná, Brasil, usando cinco locos isoenzimáticos. Para essa finalidade, foram amostradas todas as árvores masculinas do pomar, e as sementes de polinização aberta de 25 árvores matrizes (30 sementes por árvore matriz). A taxa de imigração de pólen de fora do pomar foi baixa (cerca de 1%). Contudo, foram detectados cruzamentos entre indivíduos aparentados e alta taxa de cruzamentos correlacionados ( $1 - \hat{f}_m = 0,045$ ,  $\hat{r}_{p(m)} = 0,401$ , respectivamente), indicando que a reprodução no pomar não foi aleatória. Usando análise TWOGENER do conjunto gênico do pólen, foi detectada significativa estrutura genética entre as árvores matrizes ( $\hat{\Phi}_{ft} = 0,132$ ,  $P < 0,05$ ). O número efetivo de doadores de pólen foi baixo ( $\hat{N}_{ep}$  entre 3 e 4). Assumindo um modelo de dispersão exponencial e usando a atual densidade de árvores adultas reprodutivas do pomar, estimou-se uma área efetiva de vizinhança de polinização ( $A_{ep}$ ) de 0,08 ha, o que corresponde a um raio de polinização de 15,9 m ao redor das árvores matrizes. Os resultados indicam que sementes coletadas do pomar podem apresentar significativos níveis de endogamia, altos níveis de parentesco e baixo tamanho efetivo de variância.

**Palavras-Chave:** Espécies arbóreas, Análise de paternidade, Análise TWOGENER, Distância de dispersão de pólen, Tamanho efetivo de variância

**Abstract**

Using five isozyme loci, the levels of pollen immigration, pollen dispersal distance, and mating system were investigated in a small *Ilex paraguariensis* seed orchard established in Colombo, Paraná State, Brazil. All male trees in the orchard, together with open-pollinated seeds from 25 seed-trees (30 seeds per seed-tree) were sampled for the analysis. The pollen immigration rate from outside of the orchard was low (about 1%). However, mating among relatives and high rate of correlated mating were detected ( $1 - \hat{f}_m = 0.045$ ,  $\hat{r}_{p(m)} = 0.401$ , respectively), indicating non-random mating in the seed orchard. Using TWOGENER analysis of the pollen gene pool, a significant genetic structure across seed-trees was detected ( $\hat{\Phi}_{ft} = 0.132$ ,  $P < 0.05$ ). The number of effective pollen donors was low ( $\hat{N}_{ep}$  between 3 and 4). Assuming an exponential distribution and considering the actual density of adult male trees in the orchard, it was found that the effective pollination neighbourhood area ( $A_{ep}$ ) is 0.08 ha, that corresponds to a pollination radius of 15.9 m around seed trees. The results indicate that seed collections from the orchard can present some levels of inbreeding, high levels of relatedness, and low variance effective size.

**Keywords:** Tree species, Paternity analysis, TWOGENER analysis, Pollen dispersal distance, Effective variance size

<sup>1</sup>Pesquisadora Doutora em Processos Biotecnológicos da Embrapa Florestas - Caixa Postal 319 - Colombo, PR - 83411-000 - E-mail: [snwendt@hotmail.com](mailto:snwendt@hotmail.com)

<sup>2</sup>Pesquisador Doutor da Embrapa Florestas - Caixa Postal 319 - Colombo, PR - 83411-000 - E-mail: [valderes@cnpf.embrapa.br](mailto:valderes@cnpf.embrapa.br); [sturion@cnpf.embrapa.br](mailto:sturion@cnpf.embrapa.br)

<sup>3</sup>Professora Doutora do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná - Caixa Postal 19031 - Curitiba, PR - 81531-990 - E-mail: [mquoirin@ufpr.br](mailto:mquoirin@ufpr.br)

<sup>4</sup>Pesquisadora Mestre da Embrapa Florestas - Caixa Postal 319 - Colombo, PR - 83411-000 - E-mail: [mcmazza@terra.com.br](mailto:mcmazza@terra.com.br)

<sup>5</sup>Pesquisador Doutor do Instituto Florestal de São Paulo - Caixa Postal 339 - Piracicaba, SP - 13400-970 - E-mail: [alexandresebbenn@yahoo.com.br](mailto:alexandresebbenn@yahoo.com.br)

## INTRODUÇÃO

Um pomar de sementes consiste em um plantio de árvores selecionadas onde sementes são produzidas massalmente para obter ganhos genéticos (ZOBEL e TALBERT, 1984). Pomares de sementes são de vital importância no melhoramento de espécies arbóreas, visto que o sucesso de plantios no curto e longo prazo depende da qualidade genética das sementes que o pomar produz (KAYA *et al.*, 2006). A qualidade genética das sementes é influenciada pelo sistema de reprodução no pomar, como taxa de autofecundação, contaminação por pólen não melhorado de fora do pomar, variações na fenologia de florescimento, variação individual na fertilidade masculina e distância de dispersão de pólen. Todos estes fatores podem reduzir a qualidade genética das sementes e os ganhos genéticos preditos para o pomar. Por isso, estudos dos padrões de isolamento, reprodução e dispersão de pólen são extremamente importantes para assegurar a qualidade genética das sementes produzidas em pomares de sementes (RITLAND e EL-KASSABY, 1985; WANG, 2004).

Marcadores isoenzimáticos e moleculares têm sido intensivamente utilizados para avaliar a dinâmica reprodutiva de pomares de sementes. Tais estudos têm sido conduzidos para estimar a taxa de autofecundação (XIE e KNOWLES, 1994; COTTRELL e WHITE, 1995; STOEHR e NEWTON, 2002; MORIGUCHI *et al.*, 2004), taxa de imigração ou contaminação dos pomares por pólen externo (FRIEDMAN e ADAMS, 1985; XIE e KNOWLES, 1994; ADAMS *et al.*, 1997; BUIITEVELD *et al.*, 2001; STOEHR e NEWTON, 2002; BURCZYK *et al.*, 2004; MORIGUCHI *et al.*, 2004; SLAVOV *et al.*, 2005; HANSEN e KJAER, 2006; KAYA *et al.*, 2006), variação na fertilidade ou contribuição polínica (PLOMION *et al.*, 2001; STOEHR e NEWTON, 2002), distância de fluxo de pólen dentro dos pomares (BURCZYK *et al.*, 2004), averiguação do número de doadores de pólen (MORIGUCHI *et al.*, 2004; SLAVOV *et al.*, 2005; HANSEN e KJAER, 2006) e seleção no pomar de sementes (GRATTAPAGLIA *et al.*, 2004).

Embora pomares de sementes sejam geralmente isolados de plantios da mesma espécie, para evitar a contaminação por pólen externo não melhorado, e implantados seguindo delineamentos específicos, que favorecem a reprodução por grande número de diferentes genótipos, vários estudos têm revelado intensa contaminação por pólen externo, autofecundações e desvios de cruzamentos aleatórios (PLOMION *et*

*al.*, 2001; BURCZYK *et al.*, 2004; GRATTAPAGLIA *et al.*, 2004; KAYA *et al.*, 2006). Tais resultados explicam muitas diferenças observadas entre os ganhos genéticos preditos e os realizados para as sementes coletadas dos pomares.

Os padrões de isolamento e dispersão de pólen em pomares de sementes são geralmente avaliados utilizando-se análises de paternidades. Este tipo de análise permite verificar o grau de isolamento do pomar, quantificar a taxa de autofecundação, descrever a distância e o padrão de dispersão de pólen, bem como avaliar a contribuição polínica efetiva dos indivíduos para as sementes. Contudo, análises de paternidade requerem locos marcadores com um alto grau de polimorfismo, em termos de número de alelos por loco, para garantir um mínimo poder de exclusão (>0,99) que permita confiabilidade nos resultados obtidos. Recentemente, um novo método híbrido da análise de paternidade e análise do sistema de reprodução foi proposto. Este método, denominado de análises TwoGENER, não requer uma grande quantidade de locos altamente polimórficos e que todos os genótipos de uma população tenham sido acessados para descrever os diversos aspectos do processo de reprodução, como heterogeneidade no conjunto do pólen recebido por diferentes árvores e distância de fluxo de pólen (SMOUSE *et al.*, 2001). A análise TwoGENER acessa estes fatores combinando aspectos da demografia da população estudada, como densidade de indivíduos reprodutivos e modelos de dispersão de pólen (os mais usados são o modelo normal, exponencial e leptocurtica). Essa análise tem sido eficientemente usada para descrever tais padrões em populações naturais de várias espécies arbóreas (SORK *et al.*, 2002; DICK *et al.*, 2003; DEGEN *et al.*, 2004; ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, 2004; SORK *et al.*, 2005). Considerando as características deste método, este pode também ser aplicado para descrever os padrões reprodutivos e de dispersão de pólen em pomares de sementes.

O objetivo deste estudo foi investigar o nível de isolamento e os padrões de reprodução de um pequeno pomar de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. implantado em Colombo, no estado do Paraná, usando cinco locos isoenzimáticos. Os seguintes aspectos foram acessados: i) Qual é a taxa de imigração de pólen externo não melhorado no pomar? ii) Os cruzamentos são aleatórios no pomar? iii) O conjunto de pólen recebido por diferentes árvores matrizes no pomar é homogêneo? iv) Qual é a área efetiva

de polinização e a distância média de fluxo de pólen dentro do pomar? v) Qual é o tamanho efetivo de variância de sementes coletadas de polinização aberta no pomar?

## MATERIAL E MÉTODOS

### A espécie estudada

*Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate, é uma espécie dióica críptica, com flores díclinas e um dos sexos abortivo (FERREIRA *et al.*, 1983). O período de floração ocorre de setembro a dezembro (REITZ *et al.*, 1988; SOUSA *et al.*, 2003). A polinização é realizada, principalmente, por insetos (entomófila), porém, pode ocorrer alguma transferência de pólen pelo vento. A dispersão de sementes ocorre por zoocoria, especialmente por aves (FERREIRA *et al.*, 1983). A espécie apresenta grande valor econômico pela utilização de suas folhas como chá, mas devido às suas propriedades fitoquímicas, possui grande potencial para outras aplicações industriais (MACCARI JUNIOR, 2000).

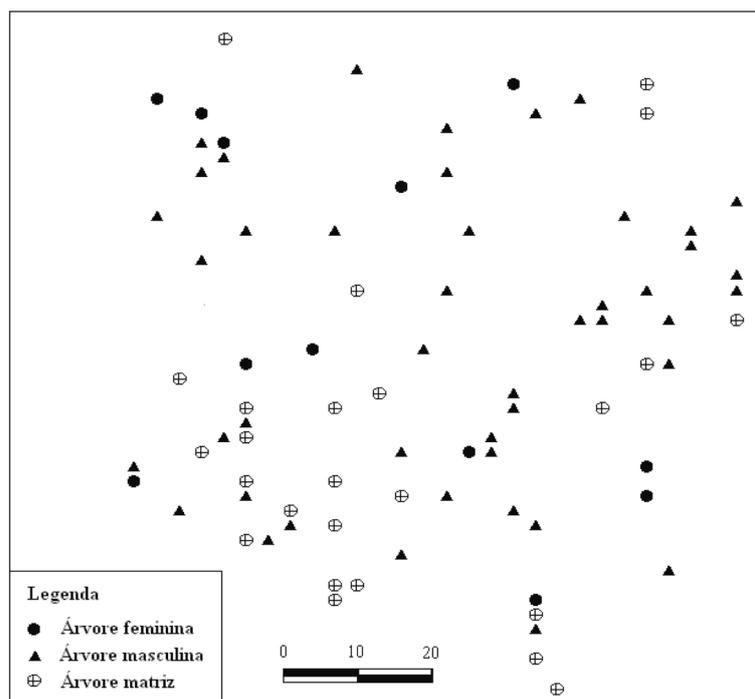
### Local de estudo e amostragem

O estudo foi conduzido em um pequeno pomar de sementes por mudas de *I. paraguariensis*, com 14 anos de idade, proveniente do desbaste em um teste de combinado de procedências e progênies (Figura 1), localizado na Embrapa Florestas, em Colombo, estado do Paraná, a 25° 20' S, 49° 14' W e 920 m de altitude. As árvores foram selecionadas para a produção de massa foliar.

O pomar é constituído por 82 árvores originadas de três procedências do estado do Paraná, Toledo (24° 43' S, 53° 45' W e 530 m de altitude), Cascavel (24° 57' S, 53° 27' W e 750 m de altitude) e Campo Mourão (24° 02' S, 52° 24' W e 590 m de altitude), e uma do estado do Rio Grande do Sul, Soledade (28° 49' S, 52° 30' W e 700 m de altitude). Da procedência Toledo foram selecionadas 21 árvores femininas e 31 masculinas; de Cascavel foram selecionadas sete árvores femininas e cinco masculinas; de Campo Mourão foram selecionadas sete árvores femininas e seis masculinas; e de Soledade duas árvores femininas e três masculinas.

Para as análises genéticas, no ano de 2003, coletaram-se tecidos foliares de 25 das 37 árvores femininas, de suas respectivas progênies (30 indivíduos por matriz) e de todas as árvores masculinas presentes no pomar (45 árvores). Doze árvores femininas não foram analisadas, pois não produziram o número de descendentes desejados.

Amostras de folhas jovens foram coletadas das árvores adultas e acondicionadas em geladeira a 5° C. Os frutos, após a coleta, foram imediatamente macerados para a separação das sementes, as quais foram secas, estratificadas para amolecimento do tegumento e maturação dos embriões, germinadas diretamente no solo e quando as plântulas atingiram, aproximadamente, 3 cm de altura e apresentaram três folíolos, foram repicadas para tubetes (30 plântulas de cada matriz).



**Figura 1.** Esquema do pomar de sementes de *Ilex paraguariensis*.  
**Figura 1.** Map of the *Ilex paraguariensis* seed orchard.

### Extração das enzimas e eletroforese

Detalhes do processo de seleção dos sistemas isoenzimáticos, dos tampões de extração e condições de corrida são encontrados em Wendt (2005). Apresentam-se aqui apenas as informações mais relevantes. O tampão de extração utilizado foi adaptado do empregado em *Araucaria angustifolia* (para detalhes ver WENDT, 2005). A separação dos produtos protéicos foi realizada a partir de eletroforese horizontal, tendo como meio suporte de penetrose (13 %) e sacarose (1,35%). Quatro sistemas isoenzimáticos foram utilizados para as análises: PGI e GOT, corridos no tampão Lítio-borato pH 8,1 e 6-PGDH e G-6PDH, corridos no tampão Tris-citrato pH 7,5. Foram analisados os seguintes locos gênicos: GOT-A, PGI-B, 6-PGDH-A, 6-PGDH-B e G6-PDH-A. A interpretação dos zimogramas seguiu padrões descritos por Alfenas (1998). As zonas codificadoras foram identificadas a partir da sua migração; a mais rápida (catódica) foi denominada de zona um; a de migração mais lenta (anódica) como dois, e assim subsequentemente. Esta identificação foi empregada tanto para as zonas, como para os alelos. O estudo detalhado da herança, segregação e ligação entre os locos indicou que os cinco locos tinham herança codominante e não estavam ligados (WENDT, 2005).

### Análise dos dados

O isolamento do pomar foi analisado por simples exclusão de paternidade, utilizando o método de máxima verossimilhança implementado no programa CERVUS 2.0 (MARSHALL *et al.*, 1998). As análises foram conduzidas a partir dos genótipos de 25 árvores matrizes e suas progênies (30 indivíduos/matriz) e de todas as 45 árvores masculinas candidatas a pai. Considerou-se pólen imigrante o pólen que fecundou o óvulo que deu origem a semente e que não teve parental masculino determinado dentro do pomar. Também foi considerada uma taxa zero de erro de tipagem entre o genótipo das plântulas e do possível candidato a pai. Com este procedimento, não foi considerado que o pai determinado era obrigatoriamente o verdadeiro pai, mas sim, que a plântula analisada poderia ter um pai dentro do pomar. Desta forma, a taxa de imigração de pólen foi determinada a partir de casos em que o genótipo das sementes não correspondia a nenhuma das possíveis árvores masculinas do pomar. Este procedimento foi adotado devido ao baixo poder de exclusão do conjunto de locos utilizados (0,520).

O sistema de reprodução foi analisado com base nos modelos de reprodução mista de Ritland e Jain (1981) e cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989), utilizando o programa "Multilocus MLTR" (RITLAND, 2002). Os parâmetros estimados foram: frequências alélicas dos óvulos e pólen; índice de fixação nas árvores maternas ( $F_{mai}$ ); taxa populacional de cruzamento multiloco ( $t_m$ ); taxa populacional de cruzamento uniloco ( $t_s$ ); taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ( $1-t_m$ ) e correlação multiloco de paternidade ( $r_{p(m)}$ ). O erro padrão das estimativas dos parâmetros foi obtido por 500 reamostragens bootstraps. O número efetivo de árvores polinizadoras ( $N_{ep}$ ) foi calculado da correlação de paternidade por  $\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p$  (RITLAND, 1989). A inferência sobre os cruzamentos aleatórios foi também realizada pelo teste de homogeneidade das frequências alélicas dos óvulos e do pólen, usando a estatística  $F_{ST}$  (WRIGHT, 1965). A significância estatística do parâmetro  $F_{ST}$  para cada loco foi obtida pelo teste de qui-quadrado, proposto por Workman e Niswander (1970):  $\chi^2 = 2n\hat{F}_{ST}(k-1)$ , com  $GL = (k-1)(s-1)$ , em que  $n$  é o número de gametas nos dois grupos (pólen e óvulo);  $k$  o número de alelos e  $s$  o número de grupos. Esta estatística também foi utilizada para verificar se as frequências alélicas do pólen efetivo divergiam das frequências alélicas das árvores masculinas e se as frequências alélicas das árvores masculinas diferiam das árvores femininas.

Os índices de fixação das árvores adultas ( $F_{at}$  masculinas mais femininas), árvores masculinas ( $F_m$ ) e das progênies ( $F_p$ ) foram calculados a partir da expressão proposta por Weir (1996). Os índices de fixação e seus respectivos intervalos de confiança, obtidos por 10.000 reamostragens bootstraps, foram estimados utilizando o programa GDA (LEWIS e ZAYKIN, 1999). O parentesco dentro das progênies foi inferido da estimativa do coeficiente médio de coancestria ( $\theta$ ) entre plantas dentro de progênies, usando a expressão proposta por Sousa *et al.* (2005) para espécies dióicas:  $\hat{\theta} = 0,125(1 + \hat{F}_p)(1 + \hat{r}_{p(m)})$ . Dos coeficientes de coancestria e endogamia das progênies, estimou-se o tamanho efetivo de variância,

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0,5}{\hat{\theta} \left( \frac{n-1}{n} \right) + \frac{1 + \hat{F}_o}{2n}}$$

$n$  é o número de plantas dentro de progênies.

Seguindo a metodologia proposta por Smouse *et al.* (2001), realizou-se a análise TWOGENER, usando o genótipo e a localização espacial das árvores matrizes e os genótipos de suas respecti-

vas progênies. O princípio do método é estimar a diferenciação no conjunto gênico do pólen ( $\Phi_{fi}$ ) recebido por diferentes árvores de uma população, usando análise de variância.

A contribuição paterna de cada semente é deduzida pela subtração do gameta materno do genótipo diplóide de cada semente, loco por loco. Após, os gametas paternos de diferentes árvores matrizes são submetidos a uma análise de variância molecular (ANOVA), de onde se obtém a medida de diferenciação genética entre o pólen recebido por diferentes árvores, a partir de uma correlação intra-classes [ $\hat{\Phi}_{fi} = \hat{\sigma}_A^2 / (\hat{\sigma}_W^2 + \hat{\sigma}_A^2)$ ], derivada dos componentes de variação genética entre a frequência do pólen de diferentes árvores ( $\sigma_A^2$ ) e dentro de árvores ( $\sigma_W^2$ ).

A análise TWOGENER foi conduzida utilizando uma implementação do algoritmo TWOGENER, programado F. Austerlitz (Université Paris-Sud, France). O intervalo de confiança a 95% de probabilidade do parâmetro foi estimado por 1.000 reamostragens bootstrap entre progênies. Adicionalmente, Austerlitz e Smouse (2001a) têm mostrado que o parâmetro  $\Phi_{fi}$  pode ser superestimado se existir endogamia na população parental. Assim, o parâmetro  $\Phi_{fi}$  foi corrigido para o coeficiente de endogamia na geração parental ( $F_p$ ) por:  $\hat{\Phi}'_{fi} = \hat{\Phi}_{fi} / (1 + \hat{F}_p)$  (AUSTERLITZ e SMOUSE, 2001a). Contudo, como o parâmetro  $\Phi_{fi}$  é medido apenas em relação ao conjunto de pólen (SMOUSE e SORK, 2004), a correção foi realizada em relação ao coeficiente de endogamia estimado nas árvores paternas ( $F_m$ ) e o parâmetro  $F_p$  foi substituído na fórmula por  $F_m$ . Do parâmetro  $\Phi'_{fi}$  foi também estimado o número de doadores de pólen por,  $\hat{N}_{ep} = 1/2 \hat{\Phi}'_{fi}$  (SMOUSE *et al.*, 2001).

Seguindo a metodologia de Austerlitz e Smouse (2001b), Austerlitz e Smouse 2002) foi estimado o valor global do parâmetro  $\Phi_{fi}$  e da distância de dispersão de pólen ( $\delta$ ), assumindo duas curvas de dispersão: uma curva normal e uma exponencial para a densidade de árvores masculinas reprodutivas do pomar ( $d=0,0045$ ). A área efetiva de vizinhança de polinização ( $A_{ep}$ ) foi calculada assumindo distribuição de pólen circular homogênea ao redor de cada árvore matriz, de raio igual à distância de dispersão de pólen,  $\hat{A}_{ep} = \sqrt{\delta^2/3}, 1415$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Taxa de imigração de pólen

Foram observados baixos níveis de imigração de pólen no pomar. Das 638 sementes ti-

padas para os cinco locos isoenzimáticos, apenas 6 (cerca de 1%) apresentaram discordância com o genótipo das 45 árvores masculinas do pomar. Esta baixa taxa pode ser erro de tipagem ou imigração real de pólen. Uma baixa taxa de imigração de pólen era esperada, dado que não existem outros exemplares da espécie próximos ao pomar. Contudo, o poder de exclusão de um candidato a pai, quando este não é o verdadeiro pai, para o conjunto de locos utilizados foi extremamente baixo (0,520, variando entre locos de 0,035 a 0,284). A causa pode ser atribuída ao limitado número de locos usados e baixo polimorfismo, em termos de riqueza alélica, típico de locos isoenzimáticos. Portanto, é interessante repetir este ensaio usando marcadores altamente polimórficos, como locos microssatélites, para confirmar o grau de isolamento aqui observado.

Comparativamente a outros estudos de imigração ou contaminação de pólen em pomares de sementes de espécies arbóreas, a taxa aqui detectada é a mais baixa já reportada. Os valores mais baixos encontrados na literatura foram de 4,3% de contaminação para um pomar clonal de *Abies nordmanniana* (HANSEN e KJAER, 2006) e 5% para *Pinus contorta* var. *latifolia* (STOEHR e NEWTON, 2002). Em geral, os valores foram muito superiores, como por exemplo, os relatados em pomares de sementes de *Pinus taeda* (46%, FRIEDMAN e ADAMS, 1985), *Picea abies* (16%, XIE e KNOWLES, 1994), *Pinus sylvestris* (48%, HARJU e NIKKANEN, 1996), *Pinus pinaster* (36%, PLOMION *et al.*, 2001), *Eucalyptus regnans* (14%, BURCZYK *et al.*, 2002), *Eucalyptus grandis* (39,2%, CHAIX *et al.*, 2003), *Cryptomeria japonica* (média de 47,8%, MORIGUCHI *et al.*, 2004) e *Pseudotsuga menziesii* (mínimo 31%, SLAVOV *et al.*, 2005). A qualidade das sementes produzidas por um pomar de sementes depende em parte do isolamento do pomar. A contaminação de pomares de sementes por pólen externo é prejudicial para a qualidade das sementes (FRIEDMAN e ADAMS, 1985; SLAVOV *et al.*, 2005), causando a redução nos ganhos genéticos preditos (FRIEDMAN e ADAMS, 1985). Assim, no presente caso, dada a baixa taxa de contaminação por pólen externo ao pomar de *I. paraguariensis*, acredita-se que o impacto da imigração é baixo ou até negligível.

### Frequências alélicas dos óvulos e pólen

A estimativa das divergências entre as frequências alélicas do pólen e dos óvulos mostrou diferenças significativas para os locos PGI-B e 6-PGDH-B ao nível de 0,1% de probabilidade (Tabela 1).

**Tabela 1.** Divergência genética entre as frequências alélicas do pólen e óvulo ( $F_{ST(PO)}$ ), árvores femininas e masculinas ( $F_{ST(FM)}$ ) e pólen e árvores masculinas ( $F_{ST(PM)}$ ) em pomar de sementes de *Ilex paraguariensis*.

**Table 1.** Genetic divergence between pollen and ovules gene frequencies ( $F_{ST(PO)}$ ), female and male trees ( $F_{ST(FM)}$ ) and pollen and male trees ( $F_{ST(PM)}$ ) in a seed orchard of *Ilex paraguariensis*.

Loco	Alelo	Pólen	Óvulo	$\hat{F}_{ST(PO)}$	Fêmeas	Machos	$\hat{F}_{ST(FM)}$	$\hat{F}_{ST(PM)}$
GOT-A	1	0,930	0,940		0,940	0,922		
	2	0,070	0,060	0,000	0,060	0,078	0,001	0,000
PGI-B	1	0,149	0,280		0,280	0,167		
	2	0,673	0,600		0,600	0,711		
	3	0,108	0,080		0,080	0,067		
	4	0,069	0,040	0,011 ***	0,040	0,056	0,012	0,002
6-PGDH-A	1	0,238	0,280		0,222	0,210		
	2	0,762	0,720	0,002	0,778	0,790	0,000	0,001
6-PGDH-B	1	0,947	0,980		0,980	0,956		
	2	0,053	0,020	0,008 ***	0,020	0,044	0,005	0,000
G-6PDH-A	1	0,795	0,780		0,786	0,530		
	2	0,205	0,220	0,000	0,214	0,470	0,072 **	0,079 **

(\*\*\*)  $P < 0,001$ ; (\*\*)  $P < 0,01$ .

Em plantas dióicas a heterogeneidade nas frequências alélicas do pólen e do óvulo pode ser atribuída a diferenças na função masculina e feminina das plantas, imigração de pólen externo à população amostrada, seleção entre o período de polinização e análise isoenzimática, amostragem não representativa das árvores maternas, desvios de cruzamentos aleatórios provocados por cruzamentos biparentais, cruzamentos entre indivíduos aparentados e variação na fenologia de florescimento e hábitos dos polinizadores. A baixa taxa de imigração de pólen indica que esta não deve ser a causa das diferenças observadas. De acordo com a comparação nas frequências alélicas das árvores masculinas e femininas (Tabela 1), existem diferenças genéticas significativas entre os sexos para o loco G-6PDH-A. Nas fêmeas, o alelo  $A_1$  foi predominante, enquanto nos machos, as frequências dos alelos  $A_1$  e  $A_2$  foram semelhantes. Contudo, isto não explica os desvios observados nos locos PGI-B e 6-PGDH-B. Acredita-se que, neste caso, as divergências entre as frequências de pólen e óvulo ocorram devido ao cruzamento entre indivíduos aparentados, cruzamentos biparentais e/ou assincronia do período de florescimento. Sousa *et al.* (2003) realizaram estudo de fenologia no pomar no mesmo ano em que foram coletadas as sementes para esse trabalho, e os resultados obtidos por esses autores confirmam assincronia no período de florescimento.

### Homogeneidade nas frequências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas

Apenas o loco G-6PDH-A apresentou divergência genética significativa ( $P < 0,01$ ) entre as

frequências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas (Tabela 1), indicando que o pólen efetivo não representa as frequências alélicas da população masculina, ou seja, o pólen não representa o conjunto gamético polínico potencial presente nos machos. Este resultado pode ser interpretado como indicativo de desvios de cruzamentos aleatórios, visto que nem todas as árvores masculinas contribuíram de forma homogênea para a descendência.

Diversos fatores podem ser responsáveis por essa divergência, dentre eles: cruzamentos biparentais, que podem estar associados às vizinhanças de polinização; variação espacial e temporal na fenologia de florescimento e fecundidade; e a proporção de árvores adultas contribuindo efetivamente no processo reprodutivo (MURAWSKI *et al.*, 1991). Outra causa pode ser a presença de cruzamentos correlacionados.

### Endogamia no pomar

A estimativa do índice de fixação foi positiva e não significativamente diferente de zero na população adulta ( $\hat{F}_a = 0,061$ ), mas positiva e significativa nas progênies ( $\hat{F}_p = 0,105$ ;  $P < 0,05$ ), indicando endogamia e sugerindo a ocorrência de seleção contra homozigotos entre as fases de sementes e adulta (Tabela 2).

Seleção contra homozigotos ou a favor de heterozigotos em espécies arbóreas tropicais foram descritos, entre outros, por Sebbenn *et al.* (2000), Sousa *et al.* (2003), Gusson *et al.* (2006) e Sobierajski *et al.* (2006), comparando as árvores adultas com suas progênies. Em espécies dióicas como *I. paraguariensis*, a única fonte geratriz de endogamia são os cruzamentos entre indivíduos parentes (endogamia biparental).

**Tabela 2.** Estimativas de parâmetros de endogamia, sistema de reprodução e fluxo de pólen em pomar de sementes de *Ilex paraguariensis*.

**Table 2.** Estimates of inbreeding, mating system and pollen flow parameters in a seed orchard of *Ilex paraguariensis*.

Parâmetros	Estimativas
<b>Endogamia</b>	
Índice de fixação na população adulta (n = 70): $F_a$	0,061 (-0,023 a 0,161)
Índice de fixação nas árvores maternas (n = 25): $F_{mat}$	-0,200 (0,193 a 0,207)
Índice de fixação nas árvores masculinas (n = 45): $F_m$	0,125 (0,016 a 0,241)
Índice de fixação nas progênes (n = 750): $F_p$	0,105 (0,001 a 0,205)
<b>Sistema de reprodução</b>	
Taxa de cruzamento multiloco ( $t_m$ )	0,955 (0,938 a 0,972)
Taxa de cruzamento uniloco ( $t_s$ )	0,964 (0,939 a 0,989)
Taxa de cruzamento entre aparentados ( $1-t_m$ )	0,045 (0,011 a 0,061)
Correlação multiloco de paternidade ( $r_{p(m)}$ )	0,401 (0,361 a 0,441)
Número efetivo de árvores polinizadoras: $\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_{p(m)}$	2,5 (2,3 a 2,8)
Coefficiente médio de coancestria dentro de progênes: $\theta$	0,186 (0,170 a 0,209)
Tamanho efetivo de variância ( $N_{e(v)}$ )	2,53 (2,26 a 2,76)
Tamanho efetivo de variância total: $\hat{N}_{e(v)(t)} = m\hat{N}_{e(v)} = 37\hat{N}_{e(v)}$	94 (84 a 102)
<b>Fluxo de pólen</b>	
Taxa de imigração de pólen: $I$ (%)	0,94 (6/638) <sup>a</sup>
Diferenciação no conjunto de pólen: $\Phi_{fi}$	0,149 (0,038 a 0,205)
Diferenciação corrigida no conjunto de pólen: $\Phi'_{fi} = \hat{\Phi}_{fi} / (1 + \hat{F}_m)$	0,132 (0,027 a 0,182)
Número efetivo de árvores polinizadoras: $\hat{N}_{ep} = 1/2 \Phi'_{fi}$	3,8 (2,7 a 18,5)
Média da distância de dispersão de pólen: modelo normal: $\delta_{normal}$ (m)	14,1
Média da distância de dispersão de pólen: modelo exponencial: $\delta_{exponencial}$ (m)	15,9
Área de vizinhança de dispersão de pólen: modelo normal: $A_{ep(normal)}$ (ha)	0,06
Área de vizinhança de dispersão de pólen: modelo exponencial: $A_{ep(exponencial)}$ (ha)	0,08

( ): IC<sub>95%</sub> = intervalo de confiança do erro padrão (EP) a 95 % de probabilidade, 1,96EP;

a: Tipados para 5 locos.

Segundo Finkeldey (2005), a endogamia biparental, igualmente como a endogamia advinda de autofecundações pode ter efeitos negativos sobre a capacidade adaptativa e reprodutiva das populações, como perda de vigor e fertilidade. Ainda, como em espécies dióicas o coeficiente de endogamia nas progênes é igual ao coeficiente de coancestria entre os parentais cruzados, é possível afirmar que a endogamia de 0,105, estimada pelo índice de fixação nas progênes (Tabela 2), foi gerada pelo cruzamento entre parentes aproximadamente no grau de meios-irmãos ( $\theta_{xy} = 0,125$ ). Isto indica que embora o pomar tenha sido desbastado, permanecem indivíduos parentes de sexos opostos e que está ocorrendo a reprodução entre eles.

Analisando-se separadamente as árvores maternas e paternas, observa-se excesso significativo de heterozigotos nas fêmeas ( $\hat{F}_{mat} = -0,200$ ,  $P < 0,05$ ) em relação ao esperado pelo modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e endogamia significativa nos machos ( $\hat{F}_m = 0,125$ ,  $P < 0,05$ ) (Tabela 2). Em espécies lenhosas dióicas, as fêmeas apresentam um esforço reprodutivo (florescimento e frutificação) superior aos machos, empregando grande parte dos seus recursos na reprodução e menos na manutenção e crescimen-

to. Consequentemente, a taxa de mortalidade é superior nas fêmeas (LLOYD e WEBB, 1977).

Esses resultados foram comprovados em estudos realizados com *Ilex aquifolium* (OBESO *et al.*, 1998). O maior número de heterozigotos observados nas fêmeas de *I. paraguariensis* poderia ser justificado pela morte prematura dos indivíduos endogâmicos, através da seleção natural, devido à menor capacidade adaptativa e ao reduzido vigor ou pela eliminação das fêmeas, supostamente homozigotas, menos produtivas da população, visto que foi realizada uma seleção em relação à produção de massa foliar.

#### Taxas de cruzamento multilocos e unilocos

As taxas de cruzamento multilocos e unilocos foram altas (>0,95) e estatisticamente diferentes da unidade (1,0), a julgar pelo intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade (Tabela 2). Em espécies dióicas, como não ocorre autofecundação, todas as diferenças das taxas multilocos e unilocos da unidade, podem ser atribuídas aos cruzamentos entre indivíduos aparentados. A diferença entre a taxa de cruzamento multilocos da unidade ( $1-t_m$ ), que no caso apresentou a menor estimativa de cruzamento, indicou a ocorrência de 4,5% de cruzamentos entre indi-

vídus parentes. Isto explica a alta endogamia observada nas progênes e confirma que realmente ocorreram cruzamentos entre parentes no pomar. Em pomares de sementes, é desejável evitar qualquer nível de endogamia. Para tanto, é necessária a eliminação dos indivíduos parentes de sexos opostos do pomar para evitar obter sementes que possam expressar algum grau de depressão endogâmica.

### Cruzamentos correlacionados

A correlação de paternidade ( $r_{p(m)}$ ) mede a proporção de indivíduos gerados por cruzamentos correlacionados (irmãos-completos). Os resultados indicaram alta taxa de cruzamentos correlacionados ( $\hat{r}_{p(m)}=0,401$ ), e que aproximadamente 40% das sementes de árvores individuais eram parentes no grau de irmãos-completos. Este resultado pode explicar os desvios observados entre as frequências alélicas das árvores masculinas e do pólen que efetivamente fecundou as árvores matrizes. As causas dos cruzamentos correlacionados são as mesmas apresentadas para a heterogeneidade nas frequências alélicas do pólen efetivo. Alta correlação de paternidade também foi encontrada em outras espécies arbóreas tropicais, como: *Carianiana legalis* ( $\hat{r}_p$  variando de 0,210 a 0,324; SEBBENN *et al.*, 2000) e *Senna multijuga* ( $\hat{r}_p$  variando de 0,249 a 0,309; RIBEIRO e LOVATO, 2004).

O número efetivo de árvores ( $N_{ep}$ ) participando na polinização foi estimado em apenas três (2,5), demonstrando forte restrição na contribuição paterna (Tabela 2). Se no pomar os cruzamentos fossem perfeitamente aleatórios, todas as árvores masculinas contribuiriam para a descendência e as progênes seriam predominantemente meios-irmãos. Neste caso, ter-se-ia detectado um valor de  $N_{ep}$  de aproximadamente de 30, visto que este foi o número de sementes coletadas por matriz. Desvios da pressuposição de panmixia, em testes de progênes de polinização aberta, podem gerar superestimativas na variância genética aditiva e nos demais parâmetros relacionados, como herdabilidade e ganhos esperados de seleção (SQUILLACE, 1974) e requerem a coleta de maiores tamanhos amostrais para programas de conservação genética *ex situ* e reflorestamentos ambientais (SEBBENN, 2002).

### Tamanho efetivo da variância

Cruzamentos endogâmicos e biparentais aumentam o parentesco dentro das progênes e reduzem o tamanho efetivo de variância. O co-

eficiente médio de coancestria dentro de progênes ( $\Theta$ ) foi estimado em 0,186, valor este que é 32,8% superior ao esperado em progênes de meios-irmãos (0,125). O tamanho efetivo de variância ( $N_{e(v)}$ ) médio para cada progênes foi estimado em 2,53. Assumindo, que as árvores matrizes não são parentes entre si e que cada uma amostra um conjunto gênico de pólen exclusivo (não sobreposto), sementes coletadas de todas as 37 árvores matrizes no pomar corresponderão ao tamanho efetivo total de 94. Este valor é 36,7% inferior ao esperado em sementes coletadas de 37 árvores matrizes de uma população idealizada.

Em uma população idealizada (tamanho infinito, cruzamentos aleatórios, ausência de seleção, mutação e migração) o tamanho efetivo de variância corresponde a quatro ( $\hat{N}_{e(v)}=0,5/\hat{\Theta}_{xy}=0,5/0,125$ ). Desvios das pressuposições que caracterizam a população idealizada causam reduções no tamanho efetivo de variância. Assim, se a reprodução fosse perfeitamente aleatória no pomar e se sementes fossem coletadas de todas as 37 árvores matrizes, o tamanho efetivo potencial do pomar seria de 148.

### Heterogeneidade no conjunto de pólen e número de doadores de pólen

A análise de variância do conjunto de pólen recebido por diferentes árvores matrizes detectou forte estrutura genética ( $\hat{\Phi}_{ft}=0,149$ ,  $P<0,05$ ). A diferenciação gênica no conjunto pode ser afetada pela estrutura genética espacial das árvores adultas, autofecundação e endogamia na população parental (AUSTERLITZ e SMOUSE, 2001a; SMOUSE e SORK, 2004). *I. paraguariensis* é dióica e, portanto, não ocorrem autofecundações, de forma que se descarta este fator como causa da alta heterogeneidade observada no conjunto de pólen. A presente população é também um pomar de sementes desbastado, a partir de alta intensidade de seleção, de forma que, se permanece alguma estruturação espacial ela é provavelmente fraca. Contudo, um algo grau de endogamia foi observado na população parental masculina (Tabela 2). Levando em conta este valor, a correção da medida de diferenciação genética entre o conjunto de pólen para o coeficiente de endogamia das árvores masculinas reduziu o valor de 0,149 para 0,132. Tal resultado sugere diferença significativa na distribuição do conjunto de pólen de árvore matriz para árvore matriz, reforçando os prévios resultados que indicam desvios de cruzamentos aleatórios dentro do pomar. Não existem relatos de estimativas de

diferenciação genética no conjunto do pólen recebido por diferentes árvores em pomares de sementes, mas o valor estimado encontra-se entre os maiores encontrados na literatura para populações naturais de outras espécies arbóreas polinizadas por animais, como *Symphonia globulifera* ( $\hat{\Phi}_{ft}=0,205$ , DEGEN *et al.*, 2004), *Dizínia excelsa* ( $\hat{\Phi}_{ft}=0,002-0,104$ , DICK *et al.*, 2003) e *Sextonia rubra* ( $\hat{\Phi}_{ft}=0,061$ , VERON *et al.*, 2005).

O número efetivo de árvores polinizadoras também pode ser estimado através do parâmetro  $\Phi_{ft}$  (SMOUSE *et al.*, 2001). Igualmente, como previamente calculado a partir da correlação de paternidade, o número efetivo de árvores polinizadoras estimado por análise TwoGENER foi baixo,  $\hat{N}_{ep}=3,8$ . A pequena diferença entre os dois cálculos se deve ao método de estimação dos valores. O modelo de cruzamentos correlacionados de Ritland (1989) usa um método de máxima verossimilhança para estimar a correlação de paternidade e, assim, explora melhor as informações multilocos (HARDY *et al.*, 2004). O modelo TwoGENER, por sua vez, estima este parâmetro indiretamente, a partir de um coeficiente de correlação intraclasse. Desta forma, pode-se esperar observar diferenças entre dois métodos. Contudo, em termos práticos, ambos indicam que um baixo número de árvores polinizadoras (três a quatro árvores) fecundou cada árvore matriz.

### **Distância de fluxo de pólen e área de vizinhança de polinização**

A estimativa da distância média de dispersão de pólen dentro do pomar foi relativamente baixa. A distância média calculada pelo modelo normal indica que o pólen é geralmente disperso dentro de uma área de vizinhança de polinização de 0,06 ha, ou dentro de um círculo com um raio de 14,1 m. A aplicação do modelo exponencial indicou uma área de polinização um pouco maior. Para este modelo a área de vizinhança foi estimada em 0,08 ha, ou uma área circular de raio igual a 15,9 m. A área de vizinhança de polinização estimada para o modelo exponencial corresponde a apenas 10% da área total do pomar, indicando uma forte limitação na distribuição do pólen. As causas são as mesmas descritas anteriormente para a correlação de paternidade, ou seja, assincronismo no florescimento e comportamento dos polinizadores visitando preferencialmente árvores próximas.

## **CONCLUSÕES**

O pomar de sementes de *I. paraguariensis* apresenta alto grau de isolamento de pólen externo.

A reprodução no pomar de sementes envolve cruzamentos entre indivíduos aparentados e cruzamentos correlacionados, gerando progênes de polinização aberta com alto grau de parentesco e endogamia.

Existe forte heterogeneidade genética no conjunto de pólen recebido por diferentes árvores maternas.

A área efetiva de vizinhança de polinização dentro do pomar é restrita, corresponde a aproximadamente 10% da área total compreendida pelo pomar.

É necessária a realização de uma nova seleção no pomar no sentido de eliminar árvores parentes de sexos diferentes.

O tamanho efetivo de variância das sementes coletadas do pomar é menor do que o tamanho efetivo potencial do pomar.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Embrapa Florestas pelo financiamento do projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, à primeira autora.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADAMS, W.T.; HIPKINS, V.W.; BURCZICK, J.; RANDALL, W.K. Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir seed orchard. *Canadian Journal of Forest Research*, Ottawa, v.27, p.131-134, 1997.
- ALFENAS, C.A. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P.S. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape: 2- relation between , pollen dispersal and inter-female distance. *Genetics*, Bethesda, v.157, p.851-857, 2001b.
- AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P.E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape: 3- impact of adult population structure. *Genetics Resources*, Cambridge, v.78, p.271-280, 2001a.

- AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P.E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape: 4-estimating the dispersal parameters. **Genetics**, Bethesda, v.161, p.355-363, 2002.
- BUIITEVELD, J.; BAKKER, E.G.; BOVENSCHEN, J.; VRIES, S.M.G. Paternity analysis in a seed orchard of *Quercus rubur* L. and estimation of the amount of background pollination using microsatellite markers. **Forest Genetics**, Svolen, v.8, p.331-337, 2001.
- BURCZYK, J.; ADAMS, W.T.; MORAN, G.F.; GRIFFIN, A.R. Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.2379-2391, 2002.
- BURCZYK, J.; LEWANDOWSKI, A.; CHALUPKA, W. Local pollen dispersal and distance gene flow in Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.197, p.39-48, 2004.
- CHAIX, G.; GERBER, S.; RAZAFIMAHARO, V.; VIGNERON, P.; VERHAEGEN, D.; HAMON, S. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.107, p.705-712, 2003.
- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lancaster, v.23, p.72-84, 1969.
- COTTRELL, J.E.; WHITE, I.M.S. The use of isozyme genetic markers to estimate the rate of outcrossing in a sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) seed orchard in Scotland. **New Forest**, Amsterdam, v.10, p.111-122, 1995.
- DEGEN, B.; BANDOUD, E.; CARON, V. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guyana. **Heredity**, London, v.93, p.585-591, 2004.
- DICK, C.W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and Africa honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p.753-764, 2003.
- FERREIRA, A.G.; KASPARY, R.; FERREIRA, H.B.; ROSA, L.M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Florestal**, Brasília, n.53, p.29-33, 1983.
- FINKELDEY, R. **An introduction to tropical forest genetics**. Göttingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, 2005. 241p.
- FRIEDMAN; S.T.; ADAMS, W.T. Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.69, p.609-615, 1985.
- GRATTAPAGLIA, D.; RIBEIRO, V.J.; REZENDE, G.D.S.P. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.109, p.192-199, 2004.
- GUSSON, E.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, p.491-502, 2006.
- HANSEN, O.K.; KJAER, E.D. Paternity analysis with microsatellites in a Danish *Abies nordmanniana* clonal seed orchard reveals dysfunctions. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.36, p.1054-1058, 2006.
- HARDY, O.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; COLAS, B.; FRÉVILLE, H.; MIGNOT, A.; OLIVERI, I. Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae): 2- correlated paternity within and among sibships. **Genetics**, Bethesda, v.168, p.1601-1614, 2004.
- HARJU, A.M.; NIKKANEN, T. Reproductive success of orchard and non-orchard pollen during different stages of pollen shedding in a Scots pine seed orchard. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.26, p.1096-1102, 1996.
- KAYA, N.; ISIK, K.; ADAMS, W.T. Mating system and pollen contamination in a *Pinus brutia* seed orchard. **New Forest**, Amsterdam, v.31, p.409-416, 2006.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: versão 1.1 para Windows 95/NT**. 1999. Disponível: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>. Acesso em: 25 setembro 2003.
- LLOYD, D.G.; WEBB, J. Secondary sex characters in plants. **Botanical Review**, Lancaster, v.43, p.177-216, 1977.

- MACCARI JUNIOR, A. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial de Cadeia Produtiva da Erva-Mate, 2000. 160p. (Série PDACT, 1)
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p.639-635, 1998.
- MORIGUCHI, Y.; TAIRA, H.; TANI, N.; TSUMURA, Y. Variation of paternal contribution in a seed orchard of *Cryptomeria japonica* determined using microsatellite markers. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.34, p.1683-1690, 2004.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, London, v.67, p.167-174, 1991.
- OBESO, J.R.; ALVAREZ-SANTULLANO, M.; RETUERTO, R. Sex ratios, size distributions, and sexual dimorphism in the dioecious tree *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae). **American Journal of Botany**, New York, v.85, p.1602-1608, 1998.
- PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; POT, D.; VENDRAMIN, G.; GERBER, S.; DECROOQ, S.; BRACH, J.; RAFFIN, A.; PASTUSZKA, P. Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.31, p.1816-1825, 2001.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988. p.284-292.
- RIBEIRO, R.A.; LOVATO, M.B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.27, p.418-424, 2004.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v.43, p.848-859, 1989.
- RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, London, v.88, p.221-228, 2002.
- RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y.A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.71, p.375-384, 1985.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v.47, p.35-52, 1981.
- ROBLEDO-ARNUCIO, J.J.; SMOUSE, P.E.; GIL, L.; ALÍA, R. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.197, p.245-255, 2004.
- SEBBENN, A.M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.14, p.115-132, 2002.
- SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, A.C.S. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.58, p.25-40, 2000.
- SLAVOV, G.T.; HOWE, T.H.; ADAMS, T. Pollen contamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeated markers. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.35, p.1592-1603, 2005.
- SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.197, p.21-38, 2004.
- SMOUSE, P.E.; DYER, R.J.; WESTFALL, R.D.; SORK, V.L. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape: 1- male gamete heterogeneity among females. **Evolution**, Lancaster, v.55, p.260-271, 2001.
- SOBIERAJSKI, G.R.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em nove populações de *Mimosa scabrella* Benthham (Leguminosaceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.71, p.37-49, 2006.
- SORK, V.L.; DAVIS, F.W.; SMOUSE, P.E.; APSIT, V.J.; DYER, R.J.; FERNANDEZ-M, J.E.; KUHN, B. Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: were have all the fathers gone? **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.1657-1668, 2002.

- SORK, V.L.; SMOUSE, P.E.; APSIT, V.J.; DYER, R.J.; WESTFALL, R.D. A two-generation analysis structure in flowering dogwood, *Cornus florida* (Cornaceae), in the Missouri Ozarks. **American Journal of Botany**, New York, v.92, p.262-271, 2005.
- SOUSA, V.A.; DAROS, T.L.; STURION, J.A. Fenologia reprodutiva de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 9, 2003, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal; Câmara Municipal de Vereadores; Câmara da Indústria e Comércio, 2003. CD-ROM.
- SOUSA, V.A.; SEBBENN, A.M.; ZIEHE, M.; HATTEMER, H. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest Genetics**, Svolen, v.12, p.107-119, 2005.
- SQUILLACE, A.E. Average genetic correlations among offspring from open-pollinated forest trees. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.23, p.149-156, 1974.
- STOEHR, M.U.; NEWTON, C.H. Evaluation of mating dynamics in a lodgepole pine seed orchard using chloroplast DNA markers. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.32, p.469-476, 2002.
- VERON, V.; CARON, H.; DEGEN, B. Gene flow and mating system of the tropical tree *Sextonia rubra*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.54, p.275-280, 2005.
- WANG, K.S. Gene flow in European beech (*Fagus sylvatica* L.). **Genetica**, Dordrecht, v.122, p.105-113, 2004.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer, 1996. 445 p.
- WENDT, S.N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 2005. 165p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- WORKMAN, P.; NISWANDER, J.L. Population studies on southwestern Indian Tribes: 2- local genetic differentiation in the Papago. **American Journal of Human Genetic**, Bethesda, v. 22, p.24-49, 1970.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, Lancaster, v.19, p.395-420, 1965.
- XIE, C.Y.; KNOWLES, P. Mating system and effective pollen immigration in a Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) plantation. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.43, p.48-52, 1994.
- ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: John Wiley, 1984. 496p.

Recebido em 15/10/2008  
Aceito para publicação em 22/06/2009