

LUCIANO ARRUDA RIBAS

**VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA E SISTEMA DE CRUZAMENTO
DE *Parapiptadenia rigida* EM UM POMAR DE SEMENTES**

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
NOVEMBRO – 1999

LUCIANO ARRUDA RIBAS

**VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA E SISTEMA DE CRUZAMENTO
DE *Parapiptadenia rigida* EM UM POMAR DE SEMENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciência Florestal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
NOVEMBRO – 1999

LUCIANO ARRUDA RIBAS

**VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA E SISTEMA DE CRUZAMENTO
DE *Parapiptadenia rigida* EM UM POMAR DE SEMENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciência Florestal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 25 de junho de 1999.

Prof. Ismael Eleotério Pires
(Conselheiro)

Pesq. Luiz Antônio dos Santos Dias
(Conselheiro)

Prof. Cosme Damião Cruz

Prof. Agostinho Lopes de Souza

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Aos meus pais, aos meus irmãos e à minha esposa, responsáveis pelo
valioso aconchego de uma família, nos períodos
turbulentos da vida.

AGRADECIMENTO

Ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o Mestrado, e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela orientação, pelo apoio em todos os momentos, pelas várias oportunidades, pelos conselhos e pelas valiosas críticas, durante os anos de amigável convivência.

À professora Ingrid Peters Robinson, pela oportunidade de avaliar os resultados de seu projeto de conservação, pela orientação e pela indispensável participação na obtenção do material para análise e na interpretação dos zimogramas.

Ao pesquisador Luiz Antônio dos Santos Dias, pela orientação, pela paciência dispensada nas leituras das várias versões deste estudo e pela presença nos momentos conclusivos deste trabalho.

Ao professor Eduardo Borges e à sua equipe, pelo apoio logístico para germinação das sementes. Também, aos funcionários do Viveiro de Produção de Mudas do IEF, que colaboraram para o aproveitamento das sementes germinadas.

Aos professores Hélio Garcia (DEF), Agostinho Lopes de Souza (DEF), Flávia Cristina (DBV) e Milene Faria Vieira (DBV), pelos livros e esclarecimentos oportunos, e ao professor Paulo de Marco (DBG), por ter facilitado alguns cálculos com o programa JACKKDIV.

À Itaipu Binacional, em especial ao Gerson, à Carla, à Sebastiana e aos engenheiros Heitor e Kaminski, por possibilitarem a implantação e manutenção do projeto-base da professora Ingrid, pelas coletas e pelos envios das sementes e pelas hospedagens facilitadas, necessários para execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Florestal, em especial à Ritinha, por estar sempre disponível para agilizar os processos burocráticos.

Aos companheiros do Laboratório de Patologia Florestal/Marcadores Moleculares da UFV (PATOMOL), dos mais antigos aos mais recentes, pela companhia nos horários imprevisíveis e durante os eventos sociais, imprescindíveis ao melhor equilíbrio entre corpo e mente. Em especial ao laboratorista Renildo, que sempre se mostrou disposto a passar dicas e a realizar favores e serviços de forma descontraída, eficiente e prestativa.

A todos os professores, colegas e funcionários da UFV, que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCIANO ARRUDA RIBAS, filho de Antônio Augusto Schroeder Ribas e Marlene Arruda Ribas, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 16 de novembro de 1970.

Cursou o 1^o grau na Escola Estadual Sagrada Família, em Belo Horizonte-MG, e o 2^o grau na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF), em Florestal, Minas Gerais.

Iniciou o Curso de Engenharia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, em março de 1992, concluindo-o em fevereiro de 1997. Em março do mesmo ano, ingressou no Curso de Mestrado em Ciência Florestal, na mesma instituição, defendendo tese em junho de 1999.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
.....	5
2.1. Coleta do material	7
.....	7
.....	9
2.1.1. Coleção regional e coleta de sementes	9
2.1.2. Pomar de sementes e coleta de sementes	10
2.2. Preparo do material para análise de isoenzimas	10
2.3. Procedimentos eletroforéticos	11
2.4. Análise dos dados	13
2.4.1. Interpretação dos zimogramas	17
2.4.2. Medidas de variabilidade genética	19
2.4.3. Sistema de cruzamento	19
2.4.4. Teste de paternidade múltipla.....	25
3. RESULTADOS	25
3.1. Descrição dos zimogramas	27
3.2. Variabilidade genética	29
3.2.1. Frequências alélicas e genotípicas.....	29
3.2.2. Estimativas dos parâmetros de variabilidade genética	31
3.2.3. Variabilidade pelo índice de diversidade de Shannon-Weaver (H').....	31
.....	33
3.3. Sistema de cruzamento	36
3.3.1. Testes das pressuposições do modelo de cruzamento misto	36
3.3.2. Estimativas dos parâmetros do sistema de cruzamento.....	41
3.4. Análise dos frutos	47
3.5. Germinação das sementes	47
4. DISCUSSÃO.....	49
4.1. Sistemas enzimáticos	50
4.2. Variabilidade genética	52
4.2.1. Variabilidade isoenzimática	56
4.2.2. Variabilidade entre populações	58
4.2.3. Germinação de sementes na avaliação da variabilidade genética ..	58

4.3. Sistema de cruzamento	58
4.3.1. Ajuste dos dados ao modelo do sistema de cruzamento misto.....	62
4.3.2. Parâmetros do sistema de cruzamento.....	64
4.3.3. Cruzamentos correlacionados.....	70
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE A	88
APÊNDICE B	90
APÊNDICE C	

RIBAS, Luciano Arruda, M.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 1999. **Variabilidade isoenzimática e sistema de cruzamento de *Parapiptadenia rigida* em pomar de sementes.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Ingrid Peters Robinson, Luiz Antônio dos Santos Dias e Ismael Eleotério Pires.

Por meio da aplicação da técnica de eletroforese de isoenzimas, foram estudados o sistema de cruzamento e a variabilidade genética presentes em um pomar de sementes de angico-gurucaia (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan). Trinta famílias, com 20 indivíduos, foram amostradas do pomar formado para conservação genética *ex situ* e produção de sementes geneticamente superiores (pomar de sementes – PS), tendo outra amostra de mesmo tamanho sido obtida de pequenos fragmentos dispostos ao longo da margem brasileira do lago da represa de Itaipu (coleção regional – CR). A partir da interpretação genética de quatro locos polimórficos (Dia-1, Dia-3, 6Pgdh-2 e Sod-2), num total de 11 alelos, estimou-se em 94,8 % a taxa de cruzamento no PS. Os níveis de variação genética nas duas condições amostradas foram similares, com 2,08 e 1,93 alelos por loco polimórfico, 73,34 e 65% de locos polimórficos, valores de heterozigosidade observada (H_o) de 0,2596 e 0,2599 e de heterozigosidade esperada (H_e) de 0,2276 e 0,2150, para PS e CR, respectivamente. Além disto, não se encontrou diferença entre as estimativas determinadas pelo índice de diversidade de Shannon-Weaver (0,4242 e 0,4265, para PS e CR, respectivamente), com base nas frequências fenotípicas de sete locos polimórficos (Adh, Dia-1, Dia-3, Est-1, Est-3, Sod-2 e 6Pgdh-2). A dispersão dos grãos de pólen em políades faz com que a maioria dos frutos formados (64%) possua sementes-irmãs completas, o que está diretamente associado à ocorrência de cruzamentos correlacionados na espécie. A formação do pomar de sementes

foi potencialmente efetiva para conservação *ex situ* da variabilidade genética existente na espécie, na região amostrada, e favorável à recombinação gênica entre indivíduos não-aparentados.

ABSTRACT

RIBAS, Luciano Arruda, M.S., Universidade Federal de Viçosa, November of 1999. **Allozyme variability and mating system of *Parapiptadenia rigida* in seed orchard.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Committee members: Ingrid Peters Robinson, Luiz Antônio dos Santos Dias and Ismael Eleotério Pires.

The mating system of angico trees [*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan] in a seed orchard (SO) established for *ex situ* conservation is described. Isozyme variability of seeds harvested in this orchard was examined and compared to seeds harvested from isolated angico trees growing in forest remnants (FR) at least 500 meters apart along the Brazilian side of the Itaipu reservoir, in Parana State. Both the samples (SO and FR) consisted of 20 seeds from each of 30 families. The outcrossing rate in the orchard population was 94.8%, based on four polymorphic loci (Dia-1, Dia-3, 6Pgdh-2 and Sod-2). The genetic variability observed in the SO and FR samples was comparable (2.07 and 1.93 mean numbers of alleles per locus; mean observed heterozygosity equal to 0.260 in both samples; mean expected heterozygosity of 0.228 and 0.215, respectively). Shannon-Weaver indices based on Adh, Dia-1, Dia-3, Est-1, Est-3, Sod-2, and Pgdh-2 loci were also comparable (0.4242 and 0.4265 for SO and FR, respectively). Pollen of *P. rigida* is packed into polyads and most fruits examined contained full sib seeds as inferred from correlated mating. We concluded that the seed orchard is effectively contributing to *ex situ* conservation of genetic variability in *P. rigida* and allowing for recombination of genotypes previously isolated among small forest fragments.

1. INTRODUÇÃO

A fragmentação de contínuos florestais expõe as populações a problemas ecológicos e genéticos causados pela endogamia e perda de variação por deriva genética. As reduções na variabilidade genética das populações de espécies arbóreas podem causar a perda da capacidade reprodutiva, da resistência a doenças e da plasticidade das populações em se adaptarem às mudanças ambientais, tornando-as suscetíveis à extinção (HEYWOOD e STUART, 1994).

Logo após a formação dos fragmentos florestais, a maioria das espécies permanece nos fragmentos por algum tempo. Contudo, os problemas causados pelo desequilíbrio do ecossistema atuam de modo a favorecer o predomínio de poucas ou de uma única espécie sobre as demais. Não obstante, pequenos fragmentos florestais ainda possuem importante valor para a manutenção da biodiversidade, embora sejam influenciados pelo tamanho, pela forma e pelo grau de isolamento entre eles, e deles em relação a grandes áreas remanescentes (TURNER e CORLETT, 1996).

A conservação dos recursos genéticos pode ser realizada em condições naturais em que se encontram (conservação *in situ*), ou fora dela (conservação *ex situ*). A conservação *in situ* é a mais recomendada, por possuir vantagens econômicas, genéticas e ecológicas sobre a *ex situ* (ERIKSSON et al., 1993). Várias espécies dependem das ações conservacionistas, tanto em virtude da continuidade da exploração dos recursos florestais, quanto da falta de conhecimentos sobre a classificação de áreas ideais ou do seu tamanho ideal para preservação, o que possibilita manter as condições ecológicas suficientes para continuidade do processo evolutivo (ZUIDEMA et al., 1996).

Sob o ponto de vista da conservação genética, a criação de pomares de sementes, compostos por indivíduos obtidos por amostragem estratificada em subpopulações, pode favorecer a recombinação genética e, conseqüentemente, a recuperação de alelos perdidos por algumas subpopulações, que, muitas vezes

reduzidas a pequenos fragmentos, aumentam a probabilidade de extinção de alelos. Esta prática, portanto, minimiza a erosão da variação genética e favorece a recombinação entre as subpopulações (ERIKSSON et al., 1993).

Estudos de variabilidade genética são desenvolvidos para conhecer o nível de variação genética dentro de populações ou espécies, bem como o modo como ela se distribui dentro e entre populações (HAMRICK, 1983). Estas questões vêm sendo abordadas com o auxílio de técnicas bioquímicas, como a análise de isoenzimas, por permitir a obtenção de estimativas da variação genética.

Isoenzimas são formas diferentes de uma mesma enzima, que ocorrem num mesmo organismo e com afinidade para um mesmo substrato. Podem ser controladas por um ou vários alelos situados num mesmo loco, ou em diferentes locos. As isoenzimas que representam a expressão fenotípica de alelos situados num mesmo loco são denominadas alozimas ou aloenzimas (ALFENAS et al., 1991). Mesmo com o desenvolvimento de técnicas moleculares que oferecem grande polimorfismo em nível de DNA, a eletroforese de isoenzimas ainda oferece algumas vantagens na obtenção das estimativas de variabilidade genética e dos parâmetros que descrevem o sistema de cruzamento (PARKER et al., 1998).

O sistema de cruzamento refere-se ao modo como os gametas se unem em uma população, na formação de sementes. Possui, portanto, importância fundamental na probabilidade de fertilização, na distribuição dos genótipos dentro de uma população, na diferenciação e no nível de fluxo gênico entre populações e no potencial evolutivo das espécies (PHILLIPS e BROWN, 1977). Além do sistema de cruzamento, os conhecimentos da biologia floral, do modo de dispersão e do comportamento das sementes no solo compõem aspectos importantes da biologia reprodutiva das espécies, sendo fundamentais para compreender a estrutura genética de populações (KAGEYAMA e DIAS, 1982). Assim, o modo de reprodução e o sistema de cruzamento característicos da espécie de interesse determinam como a variabilidade genética se organiza no

espaço e no tempo, sendo essas informações necessárias para o estudo, o monitoramento e a manutenção da variabilidade genética em programas de conservação.

Os modelos de cruzamentos foram desenvolvidos com o uso das teorias de genética de população, e são utilizados como base para a análise de dados genéticos. O modelo que melhor corresponde à realidade da distribuição da variação genética em populações naturais de espécies arbóreas é o de cruzamento misto, que considera tanto a ocorrência de fecundação cruzada (t) quanto a de autofecundação ($s=1-t$). Desta forma, os indivíduos que compõem uma família, ou seja, sementes ou indivíduos obtidos de um mesmo genitor materno, podem ser meios-irmãos ou irmãos completos entre si, sendo as proporções ditadas pelas taxas de autofecundação (s), de fecundação cruzada (t) e da frequência alélica (p) no pólen da população (BROWN e ALLARD, 1970).

A espécie *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae - Mimosoideae), vulgarmente conhecida como angico-gurucaia, angico-vermelho, angico-cedro, angico-do-banhado e outros, ocorre no sul dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo, sendo comum até o Rio Grande do Sul. Nos países vizinhos ao sul do Brasil, ocorre no Paraguai, na Argentina e no Uruguai (CARVALHO, 1994).

O angico-gurucaia é caracterizado como espécie secundária inicial, agressiva, tolerante ao frio e indiferente às condições físicas do solo. Possui madeira considerada altamente valiosa, pela sua durabilidade, boa qualidade para lenha e produção de carvão. Diante da grande demanda de sua madeira e da ocorrência em região historicamente agrícola, a espécie encontra-se ameaçada de extinção (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1986).

A Companhia Hidrelétrica de Itaipu, para prevenir o assoreamento do lago formado pelo represamento do rio Paraná e garantir a qualidade da água, vem realizando a recomposição de matas ciliares às margens do lago, mediante o plantio de mudas de espécies florestais nativas na região. Visando a conservação

ex situ de espécies arbóreas tropicais, a produção de sementes de boa qualidade para formação de mudas utilizadas nas matas ciliares e atender às necessidades de sementes pelas comunidades vizinhas, formou-se, em 1991, um pomar de sementes por mudas, a partir de uma amostragem estratificada de sementes, realizada ao longo da margem brasileira do lago de Itaipu (PETERS-ROBINSON e ZELAZOWSKI, 1991).

Neste trabalho objetivaram-se: i) descrever o sistema de cruzamento em um pomar de sementes de *P. rigida*; ii) quantificar e comparar a variação genética presente no pomar de sementes e na coleção regional formada por 30 famílias amostradas ao longo da margem brasileira do lago de Itaipu; e iii) avaliar a eficiência do pomar de sementes quanto à estratégia de amostragem que foi utilizada para a conservação *ex situ* da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material

As sementes utilizadas para as análises genéticas foram coletadas em 1997, em árvores de uma população de ocorrência natural (coleção regional) e, também, de árvores compondo um pomar de sementes. As árvores amostradas estão localizadas na região oeste do Estado do Paraná, à margem brasileira da represa da usina hidrelétrica de Itaipu (Figura 1).

A região compreende uma faixa que se estende por 2.915 km, acompanhando o contorno do lago de Itaipu, desde Guaíra (24° 04' 44" de latitude sul e 54° 18' 02" de longitude) até Foz do Iguaçu (25° 32' 45" de latitude sul e 54° 35' 07" de longitude). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é Cfa, típico de clima mesotérmico, subtropical úmido, com verões quentes, sem estação seca, de inverno definido e geadas pouco frequentes. Apresenta precipitação média anual de 1.650 mm, evaporação média anual de 1.000 mm e temperaturas média, máxima e mínima anuais de 21, 40 e -4°C, respectivamente. Como parte da zona da mata pluvial-subtropical nas margens do rio Paraná, em 1976 a região se apresentava com 22,9% de remanescentes

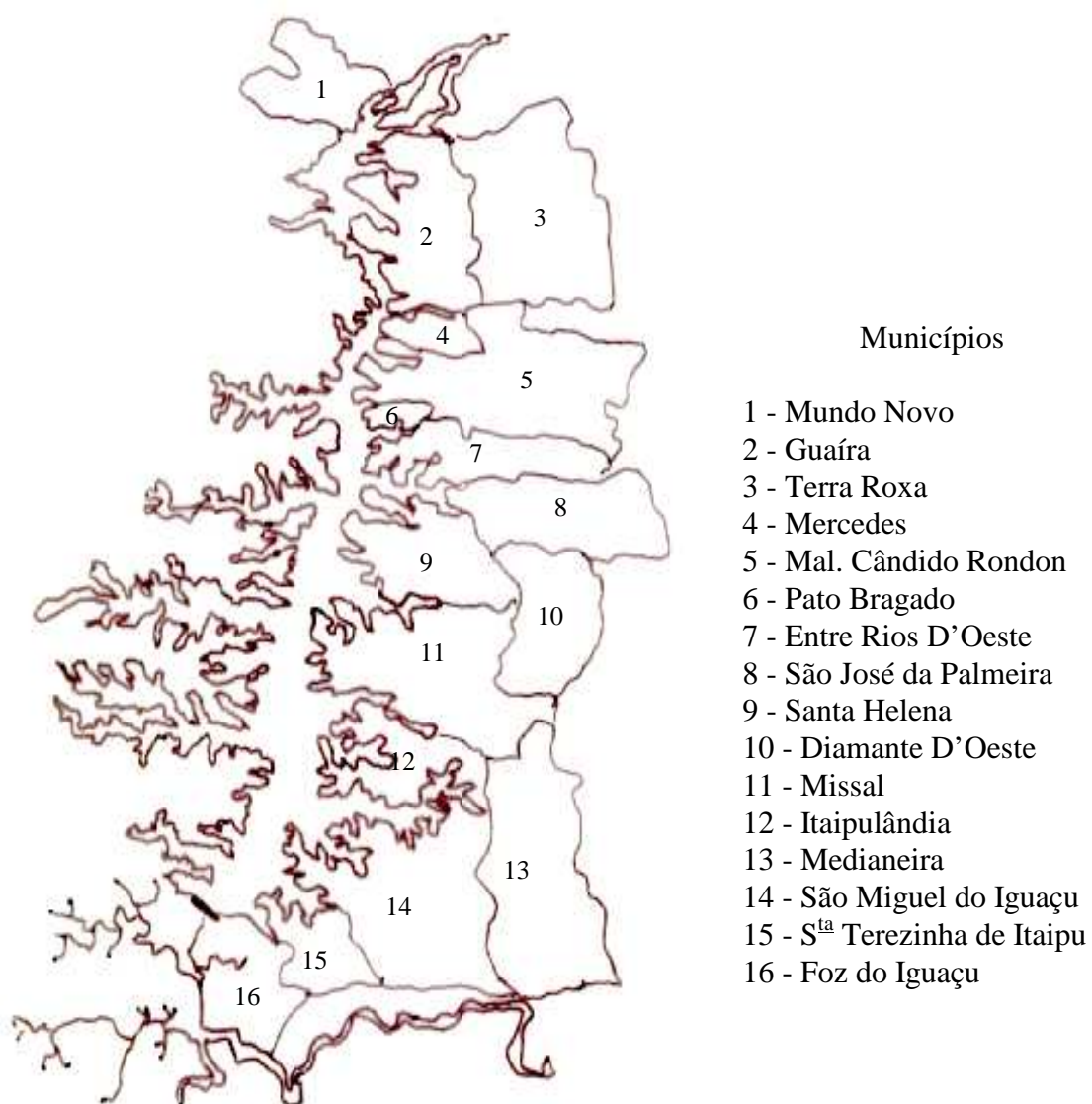


Figura 1 - Mapa esquemático do lago da represa da Itaipu Binacional, sendo enumerados todos os municípios contidos na extensão em que foram amostradas as famílias da coleção regional.

florestais, 24,8% de capoeira e 50,3% de culturas agrícolas (MAACK, 1968; NETTO, 1984).

2.1.1. Coleção regional e coleta de sementes

Com o objetivo de realizar uma amostragem representativa de toda a população da espécie à margem brasileira do lago, formado pelo represamento de 200 km do rio Paraná, coletaram-se, separadamente, sementes de 30 árvores-matrizes, espaçadas de, no mínimo, 500 m entre si. Ao longo de 2.915 km, as árvores amostradas localizavam-se nos fragmentos florestais remanescentes da Floresta Estacional do Rio Paraná e às margens de estradas que cortam as propriedades rurais da região.

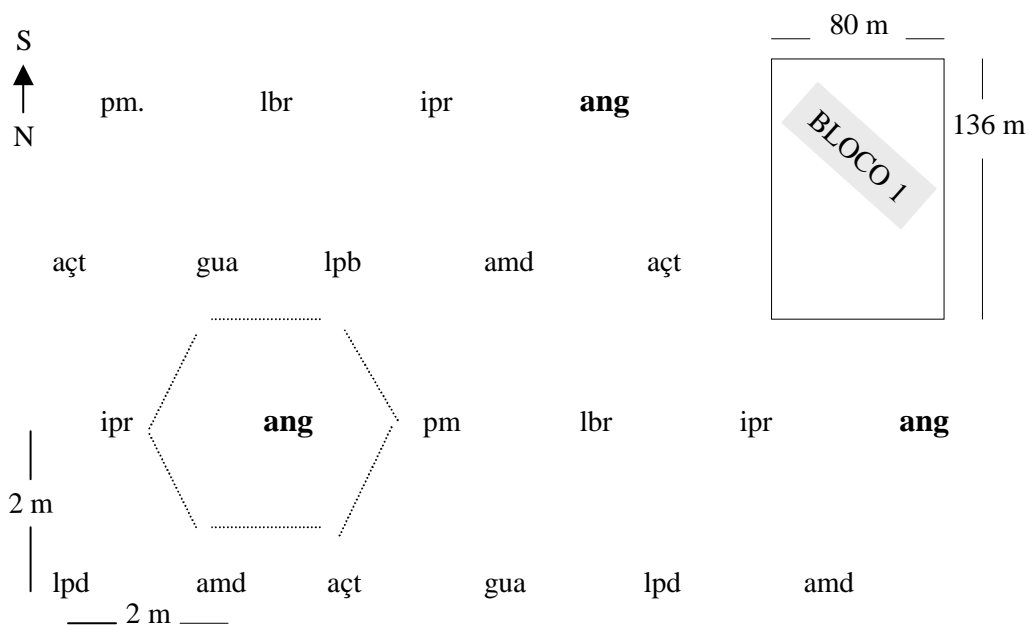
Em 1991, as mudas obtidas de sementes dessas árvores ou de árvores localizadas próximo a estas foram usadas para compor um pomar de sementes experimental da Itaipu Binacional.

2.1.2. Pomar de sementes e coleta de sementes

O pomar de sementes de Itaipu está localizado no Refúgio de Bela Vista, em Foz do Iguaçu, o qual faz parte do sistema de reservas biológicas pertencentes à Itaipu Binacional. Essa população está a 220 m de altitude e visa a conservação *ex situ* de 15 essências florestais nativas, entre elas o angico-gurucaia. O pomar compreende seis blocos, cada qual medindo 80 m por 136 m. Em cada bloco existem três plantas, representando a progênie de cada uma das 30 matrizes originais, por espécie. As 90 árvores de cada espécie, presentes em cada bloco, estão espaçadas 8 m entre si e cercadas por representantes de seis outras espécies dentro de parcelas hexagonais (Figura 2). Para o presente trabalho, foram

coletadas, em 1997, sementes de 30 árvores de angico-gurucaia presentes no bloco 1 do pomar.

Em julho de 1998, realizou-se outra coleta no pomar de sementes. Enquanto nas coletas anteriores era mantida, separadamente, grande quantidade de sementes colhidas de cada uma das 30 árvores, para, em seguida, obter uma amostra para análise genética, na coleta de 1998 foram obtidos 36 frutos de nove árvores do pomar (4 frutos/árvore), em posições opostas das copas. Para impedir que as sementes fossem liberadas pela deiscência dos frutos e se misturassem, estes foram mantidos fechados individualmente, com o auxílio de barbante. Sabendo-se que a espécie estudada produz políades, com essa coleta pretendeu-se obter material para realizar estudos sobre a influência das políades no sistema de cruzamento da espécie.



As abreviauras representam os nomes comuns para as seguintes espécies: pm = pau-marfim, lbr = louro-branco, ipr = ipê-roxo, açt = açoita-cavalo, gua = guapuruvu, lpb = louro-pardo, amd = amendoim e ang = angico-gurucaia.

Figura 2 - Disposição (linhas e colunas) das plantas no pomar de sementes de um dos blocos e disposição hexagonal de outras espécies em torno de uma planta de angico-gurucaia.

2.2. Preparo do material para análise de isoenzimas

Tanto as sementes coletadas das 60 árvores em 1997 (30 no pomar de sementes e 30 na coleção regional) quanto aquelas dos frutos das nove árvores coletadas em 1998 foram preparadas para análise de isoenzimas, na Universidade Federal de Viçosa, viçosa-MG.

Das sementes coletadas em 1997, utilizaram-se grupos de 75 a 125 sementes por árvore-matriz. As sementes foram acondicionadas para germinação sobre papel germitest, umedecido com água deionizada, dentro de caixas gerbox, em geminador mantido a 25°C, com 100% de umidade relativa e sob luz contínua. Foram feitas contagens das sementes germinadas a cada 24 horas, como também a seleção para análise de isoenzimas.

Para essa análise, selecionaram-se as 20 sementes que germinaram primeiro, por grupo de sementes de cada árvore-matriz. Obtiveram-se, portanto, 30 famílias com 20 indivíduos, para a coleção regional e para o pomar de sementes. O termo família refere-se a sementes obtidas por polinização livre, coletadas em uma única árvore, podendo incluir meios-irmãos e irmãos completos, conforme a origem do pólen.

Já as sementes coletadas em 1998 foram mantidas dentro dos frutos até o momento de serem colocadas para germinar, nas mesmas condições citadas anteriormente. No entanto, as sementes de cada fruto foram dispostas dentro do mesmo gerbox, visando manter o controle por fruto e por região da copa de cada uma das nove árvores amostradas no pomar.

2.3. Procedimentos eletroforéticos

As análises eletroforéticas foram realizadas no Laboratório de Patologia Florestal e Marcadores Moleculares/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa.

O sistema-tampão gel/eletrodo utilizado corresponde ao nº 9, conforme citação em ALFENAS e BRUNE (1998), tendo os sistemas enzimáticos utilizados sido escolhidos, inicialmente, com base nos resultados de RIBAS et al. (1997). Além das enzimas selecionadas pelos autores, desenvolveram-se novos testes com o material em estudo. Foram selecionadas as seguintes enzimas: diaforase (DIA, EC 1.8.1.4), esterase (EST, EC 3.1.1.1), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.49), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) e álcool desidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1), por apresentarem locos polimórficos, bem ativos e de boa resolução.

Nessa etapa, foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam a radícula exposta. As sementes germinadas eram envolvidas, individualmente, em papel alumínio, identificadas e imersas em nitrogênio líquido, antes de serem armazenadas em freezer, a 85°C negativos.

As proteínas foram extraídas do eixo embrionário e do endosperma de sementes germinadas individualizadas, mediante trituração com o auxílio de almofariz e pistilo de porcelana, contendo 350 µl da solução-tampão extratora número 1 de ALFENAS et al. (1991).

Para preparo dos géis, aplicação das amostras, corrida eletroforética, corte dos géis em fatias, revelação das enzimas, secagem e armazenamento dos géis, utilizaram-se as recomendações descritas em ALFENAS et al. (1991). As fatias de gel, coradas e fixadas, foram fotodocumentadas e digitalizadas, segundo os procedimentos descritos em ALFENAS e BRUNE (1998).

2.4. Análise dos dados

2.4.1. Interpretação dos zimogramas

Para interpretação dos zimogramas, esquematizaram-se, em papel milimetrado, as zonas de atividade e suas respectivas bandas eletroforéticas,

detalhando-se as distâncias de migração, a largura e a intensidade das bandas. As regiões de atividade foram numeradas em ordem decrescente de mobilidade, em relação à origem, de modo que a região com as bandas eletroforéticas de maior mobilidade para o sistema isoenzimático foi identificada como região 1 (ex: Sod-1).

Na descrição do polimorfismo observado nos locos isoenzimáticos, utilizaram-se letras minúsculas para designar a expressão dos diferentes alelos no mesmo loco. Portanto, identificou-se como a o alelo de maior mobilidade em cada loco, e assim sucessivamente, até o alelo menos móvel em relação à origem. Para esses sistemas enzimáticos interpretados geneticamente, a descrição do polimorfismo resultou na genotipagem dos indivíduos nas famílias amostradas.

Os padrões de bandas revelados de sistemas enzimáticos não-interpretados geneticamente foram esquematizados em papel milimetrado, e os diferentes fenótipos encontrados foram codificados para ordenar a leitura dos géis. A leitura foi realizada diretamente nos géis originais e, ou, a partir do material fotodocumentado.

2.4.2 Medidas de variabilidade genética

Para estimar a variabilidade genética com base nas freqüências gênicas dentro da coleção regional e do pomar, utilizaram-se o número médio de alelos por loco polimórfico (A), a proporção de locos polimórficos (P), as heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) e, com base nas freqüências fenotípicas, o índice de diversidade (H') de SHANNON e WEAVER (1964).

As estimativas do índice de diversidade de Shannon-Weaver foram obtidas mediante o uso do programa JACKKDIV (de autoria do professor Paulo de Marco, DBG / UFV), que permite estimar o índice e as suas variâncias, pelo uso da técnica de reamostragem numérica Jackknife.

Segundo SHANNON e WEAVER (1964), a função é definida por:

$$H' = - \sum_{i=1}^n P_i \times \log P_i$$

em que

n = número de classes fenotípicas;

P_i = frequência fenotípica na classe i; e

log = logaritmo com base 2.

Obtiveram-se as estimativas do índice e, dada à reamostragem dentro de locos, as variâncias para os locos Adh, Dia-1, Dia-3, Est-1, Est-3, Pgd-2 e Sod-2, para a coleção regional e a do pomar. Com o auxílio do programa *Statistica for Windows* - STAT (1995), foram obtidos os limites do intervalo de confiança (a 5% de probabilidade) para cada loco, o que refletiu diretamente na igualdade entre as estimativas obtidas para o mesmo loco, na coleção regional e na do pomar de sementes.

Para se obterem as outras medidas de variabilidade (frequências alélicas, número médio de alelos por loco polimórfico (A), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) nas populações), utilizou-se o programa BIOSYS-1 (SWOFFORD e SELANDER, 1989). As estimativas foram obtidas para cada família, com base nos locos interpretados geneticamente (no caso: Sod-2, Dia-1, Dia-3 e Pgdh-2, perfazendo um total de 11 alelos). Para a coleção regional e para o pomar de sementes, as estimativas foram obtidas a partir da média das 30 famílias, respectivamente.

A porcentagem de locos polimórficos (P), considerando loco polimórfico aquele que possui seu alelo mais comum a uma frequência de até 95%, foi estimada pela função do número de locos polimórficos em relação ao número total de locos analisados.

Estimou-se o número médio de alelos por loco polimórfico (A), em função do somatório do número de alelos nos locos polimórficos em relação ao número de locos polimórficos.

A heterozigosidade observada (H_o) em um loco particular foi obtida pela expressão (BROWN e WEIR, 1983):

$$\hat{H}_o = 1 - \sum P_{ii}$$

em que P_{ii} é a freqüência observada de homozigotos, para o i -ésimo alelo no loco em questão.

A heterozigosidade esperada (H_e) no mesmo loco em particular foi obtida por (NEI, 1978):

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

em que p_i é a freqüência esperada do i -ésimo alelo no loco analisado.

As estimativas de H_o e H_e foram obtidas por família como a média dos valores obtidos para os quatro locos analisados. Para obtenção destas medidas em nível de população, calcularam-se as médias a partir das estimativas das 30 famílias da coleção regional e do pomar de sementes, respectivamente.

2.4.3. Sistema de cruzamento

Para obter o sistema de cruzamento com base nas freqüências gênicas obtidas da análise isoenzimática, utilizou-se o programa MLTR - *Multilocus Mating System Program* (RITLAND, 1994).

As estimativas foram obtidas pela interpretação genética dos locos isoenzimáticos: Sod-2, Dia-1, Dia-3 e Pgdh-2, para as 30 famílias amostradas do pomar de sementes e, posteriormente, para as nove famílias representadas pelos frutos colhidos em 1998. Estimaram-se os seguintes parâmetros:

1 - taxa de fecundação cruzada, com base em locos múltiplos, estimada em nível de população (t_m);

2 - taxa de fecundação cruzada para cada loco individualmente, obtendo-se a média das estimativas para a população (t_s);

3 - coeficiente de endogamia de Wright, com base nos locos individuais (F);

4 - correlação entre pares de sementes quanto ao cruzamento (r_t); e

5 - correlação entre grãos de pólen dos pares de sementes de fecundação cruzada (r_p), correspondente à probabilidade de duas famílias tomadas ao acaso serem irmãs completas.

Além das estimativas dos parâmetros, o programa também calcula as frequências alélicas no conjunto de pólen (p) e nos óvulos e determina os genótipos maternos.

A rotina do programa, desenvolvida para estimar os parâmetros do sistema de acasalamento, foi descrita em RITLAND e JAIN (1981), e outros detalhes sobre a estimativa dos genótipos maternos e da frequência gênica no conjunto de pólen podem ser encontrados em BROWN e ALLARD (1970) e em RITLAND (1983), respectivamente.

Todas as estimações desenvolveram-se com base nas frequências genotípicas obtidas das famílias analisadas. A partir destas frequências, podem ser obtidos os genótipos das árvores-matrizes (genótipos parentais maternos), o grupo de pólen (p), a taxa de cruzamento (t) e o coeficiente de endogamia de Wright (F). Todos estes parâmetros foram utilizados, simultaneamente, durante a rotina de estimação, por meio da solução de equações de probabilidade, envolvendo o método de máxima verossimilhança. A convergência das estimativas de máxima verossimilhança dos parâmetros do sistema de cruzamento desenvolve-se comparativamente ao modelo de cruzamento misto, utilizando o método de maximização da esperança (ME), como auxiliar para limitar as estimativas ao intervalo de 0 a 1. A descrição do processo de estimação de máxima verossimilhança das estimativas dos parâmetros do sistema de acasalamento, bem como o método auxiliar, é apresentada por RITLAND e EL-KASSABY (1985).

As variâncias das estimativas dos parâmetros foram obtidas, gerando 100 repetições, pelo método “bootstrap” (WEIR, 1990), em que as famílias dentro das populações foram unidades de reamostragem.

Os parâmetros de sistema de cruzamentos correlacionados (r_t e r_p) são estimadores das frequências de autofecundação e fecundação cruzada dentro de famílias, considerando a origem dos gametas. O método para obter essas estimativas, conhecido como “modelo de pares de progênies” (*progeny-pair model*), baseia-se em repetidas amostragens de pares de sementes das famílias dentro de população, seguidas pela comparação entre os genótipos das duas sementes amostradas (RITLAND, 1989). Desta forma, em cada repetição, pode-se inferir a origem do pólen para aquele par de genótipos, podendo ser ambas formadas por autofecundação, uma por autofecundação e outra por fecundação cruzada, ou ambas por fecundação cruzada, devendo-se ressaltar que, neste último, os grãos de pólen podem ter sido originados de apenas uma única árvore ou de diferentes árvores.

Segundo RITLAND e JAIN (1981), o modelo de cruzamento misto apresenta as seguintes suposições:

1. Todos os genótipos maternos cruzam numa mesma taxa, a partir de um conjunto de pólen geneticamente homogêneo sobre a população.
2. Os alelos de diferentes locos segregam independentemente.
3. A segregação dos alelos em plantas maternas heterozigotas é estritamente mendeliana em uma razão de 1:1, tanto para produção de pólen como de óvulo.
4. Os marcadores isoenzimáticos não são afetados por seleção e mutação entre o tempo de cruzamento e a amostragem das famílias.

Alguns testes foram aplicados para verificar a grandeza dos possíveis desvios dos dados obtidos do pomar de sementes, em relação às pressuposições do modelo de cruzamento.

O teste qui-quadrado foi essencial nessa etapa, tendo sido aplicado em todas as situações. Para ambas as condições de amostragem, aplicou-se o teste de qui-quadrado para verificar a existência de desvios do equilíbrio de Hardy-

Weinberg, considerando o número observado e esperado de 11 alelos e quatro locos.

Para verificar a homogeneidade na distribuição dos grãos de pólen sobre a população, como também a associação entre os locos analisados, foram utilizadas as metodologias descritas em O'MALLEY et al. (1988). No primeiro caso, o teste de qui-quadrado foi aplicado para verificar a homogeneidade no número de sementes heterozigotas nas famílias de árvores homozigotas identificadas no pomar. Seu uso permite verificar se mães homozigotas, para o mesmo alelo, produzem quantidades comparáveis de genótipos heterozigotos, com base na lógica de que se a mãe é homozigota todas as sementes heterozigotas produzidas são resultantes de fecundação cruzada. Desta forma, ao testar a homogeneidade na distribuição de heterozigotos entre as famílias, estará sendo verificado se as árvores-mães receberam proporções comparáveis de grãos de pólen.

A verificação de associações entre locos foi realizada com o uso de tabelas de contingência para independência dos respectivos locos. Ao relacionar o número de amostras para todas as possíveis combinações de genótipos entre pares de locos, verifica-se que o teste de qui-quadrado aplicado em tabelas de contingência indica desajustes quanto às distribuições das frequências nas colunas e linhas das tabelas. A existência de variação na distribuição das amostras é considerada como tendência, em virtude da associação entre genes de diferentes locos.

2.4.4. Teste de paternidade múltipla

A existência de políades na espécie estudada conduziu ao desenvolvimento de um estudo rápido, para compreender melhor a sua influência no processo de distribuição dos gametas durante o cruzamento entre plantas.

Utilizando a metodologia aplicada por MUONA et al. (1991), para a *Acacia melanoxylon* R. Br., desenvolveram-se testes que permitiram avaliar a possibilidade de mais de uma políade poder fecundar a mesma flor. Os testes baseiam-se no grau de parentesco entre as sementes de cada fruto, podendo variar de irmãs completas (uma única políade) a meias-irmãs.

Mediante o uso dos genótipos resultantes da interpretação dos locos Sod-2, Dia-1, Dia-3 e 6Pgdh-2 para as sementes dos frutos colhidos das nove árvores do pomar, em 1998, e dos genótipos maternos estimados pelo MLTR, foram obtidos os alelos multilocos trazidos pelos grãos de pólen que participaram da fertilização e formação de cada semente. Em seguida, utilizaram-se três critérios para detectar a paternidade múltipla para cada fruto:

1 - Presença de mais de dois tipos de alelos no conjunto de grãos de pólen de um único fruto.

2 - Teste de segregação multilocos, aplicado somente para os frutos que receberam contribuição paternal de dois tipos distintos de alelos, para mais de um loco. Os frutos foram testados para verificar a evidência de segregação dos alelos nos diferentes locos, comparando as frequências genotípicas encontradas com as esperadas em condição de segregação multilocos independente. O resultado de ocorrência de paternidade múltipla baseia-se na distribuição uniforme dos gametas nas classes genotípicas, segundo a distribuição dos alelos existentes nos gametas masculinos e femininos. A hipótese de paternidade múltipla foi testada a 1%.

3 - Presença de mais de oito cópias do mesmo alelo comum aos grãos de pólen, em um loco. Este método baseia-se na premissa de que, se existe uma

única políade por estigma, não pode existir mais do que oito cópias de um mesmo alelo de uma fonte de pólen heterozigota.

Utilizando o mesmo material, verificou-se a ocorrência de autofecundação na formação de cada fruto. Este estudo foi baseado na comparação entre os alelos do genótipo multilocos materno e os alelos do mais provável genótipo multilocos paterno em cada fruto, devendo-se ressaltar que, se existisse algum alelo compondo o genótipo paterno que não existisse no genótipo materno, tratava-se de um caso não-ambíguo de fecundação cruzada, com envolvimento de pelo menos uma políade.

Os genótipos multilocos maternos foram estimados pelo MLTR, em que as famílias eram compostas por sementes de todos os frutos da mesma planta. Já na estimação dos mais prováveis genótipos paternos, baseou-se em famílias compostas por sementes de um mesmo fruto, e não de uma mesma árvore, como anteriormente citado. Na comparação, excluíram-se os alelos que possivelmente foram introduzidos pelo conjunto de pólen, e assim sucessivamente, para os quatro locos dentro de cada fruto, estimando-se o mais provável genótipo paterno.

3. RESULTADOS

3.1. Descrição dos zimogramas

Dos cinco sistemas enzimáticos selecionados, utilizaram-se sete locos polimórficos, com boa atividade e resolução e com padrões de bandas interpretáveis (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7).

Detectaram-se três zonas de atividade de superóxido dismutase (SOD), e inferiu-se que cada uma é controlada por um loco (Figura 3). As zonas de maior (Sod-1) e menor (Sod-3) mobilidade apresentaram boa atividade e resolução, sendo a primeira monomórfica e a segunda aparentemente polimórfica. Todavia, dada à baixa resolução deste último para a maioria das famílias, ele não foi usado nas interpretações genotípicas.

O loco Sod-2, com três alelos, permitiu a distinção de cinco genótipos. O genótipo cc não foi detectado em quaisquer das famílias. O padrão das bandas correspondente ao genótipo ab ilustra a estrutura dimérica da enzima, conforme citado por ALFENAS et al. (1991, 1998). No entanto, nos padrões genotípicos ac e bc não se visualizou a banda heterodimérica, possivelmente por causa da formação de heterodímeros sem atividade enzimática (genótipo ac) ou da não-formação de heterodímeros pelos polipeptídeos resultantes do alelo c (genótipo

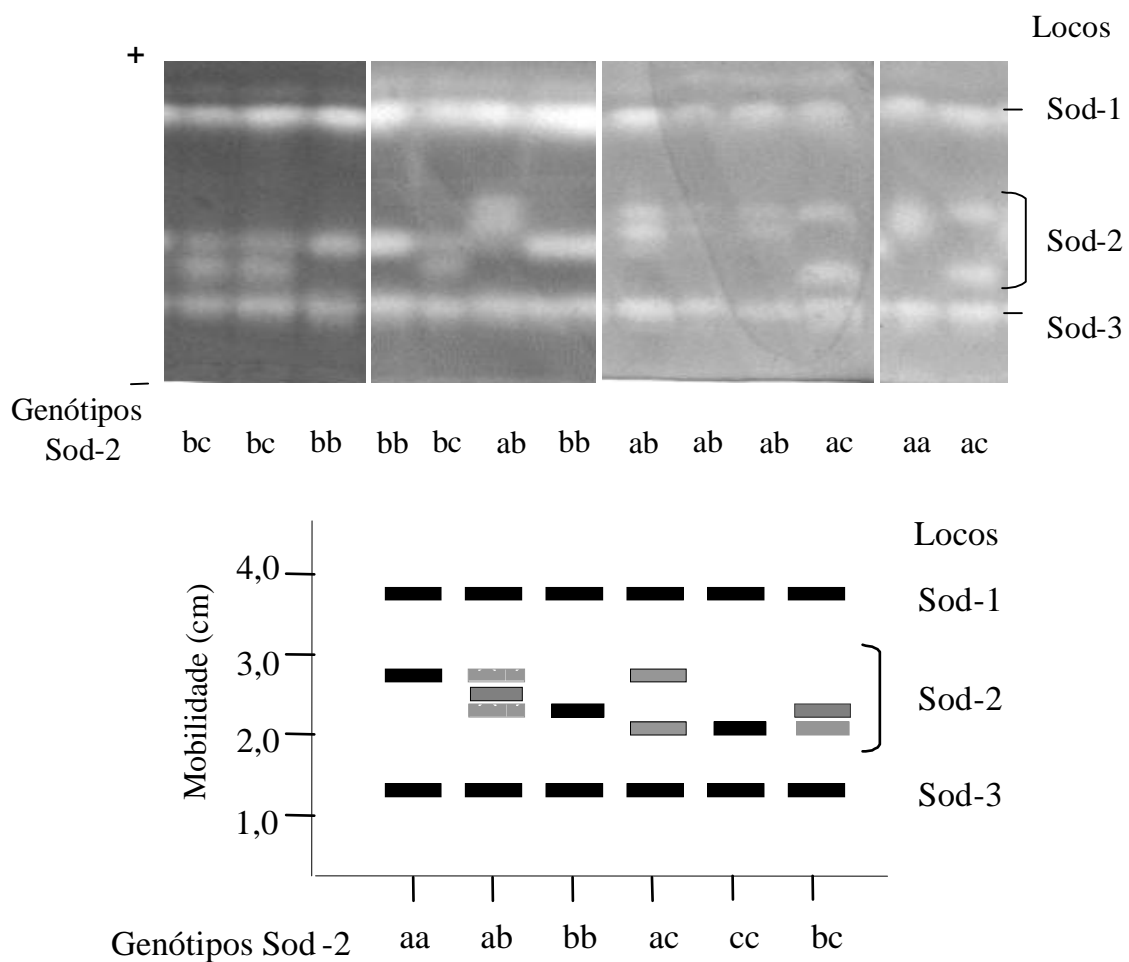


Figura 3 - Padrão isoenzimático de superóxido dismutase em sementes de *Parapiptadenia rigida* e representação esquemática dos possíveis fenótipos para este sistema, com interpretação genotípica para o loco polimórfico Sod-2.

bc). Na coleção regional, predominou o genótipo bb e não foram detectados os genótipos aa e ac nas amostras analisadas.

A enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) exibiu duas zonas de atividade, sendo a de maior mobilidade monomórfica, enquanto a menos móvel (6-Pgdh-2) apresentou quatro alelos (Figura 4). Para esse loco, distinguiram-se nove genótipos na coleção regional e apenas oito no pomar de sementes, em razão da ausência do genótipo ad em suas famílias. O fenótipo correspondente ao padrão homozigoto para o alelo d não foi detectado em nenhuma amostra.

Os géis corados para diaforase (DIA) mostraram três zonas de atividade enzimática, tendo Dia-1 e Dia-3 se apresentado como polimórficos e o loco intermediário, como monomórfico (Figura 5). Ambos os locos polimórficos apresentaram padrão de bandas característico de enzima monomérica. O loco Dia-3 apresentou-se com atividade e resolução instáveis, o que impossibilitou sua interpretação para algumas famílias. O genótipo aa, do Dia-1, predominou na maioria das amostras. Em algumas famílias encontrou-se uma banda adicional mais anódica, considerada artefato, observada na maioria das amostras com maior espessura, baixa resolução e menor atividade que as demais bandas desse loco.

A álcool desidrogenase (ADH) apresentou uma única zona de atividade, mas altamente polimórfica (Figura 6). Muito ativa na espécie, a enzima apresentou diferentes padrões de bandas não-interpretáveis geneticamente, mas que possibilitaram distinguir 12 fenótipos, sendo dois destes correspondentes a padrões de genes em homozigose (fenótipos 1 e 12). Os fenótipos 10 e 11 foram detectados apenas na coleção regional.

Encontraram-se quatro zonas de atividade para esterase (EST), sendo uma delas com migração catódica (Figura 7). As duas zonas anódicas de maior migração foram consideradas como locos distintos, no entanto, a de menor mobilidade (região 2) apresentou-se muito instável e com resolução muito baixa.

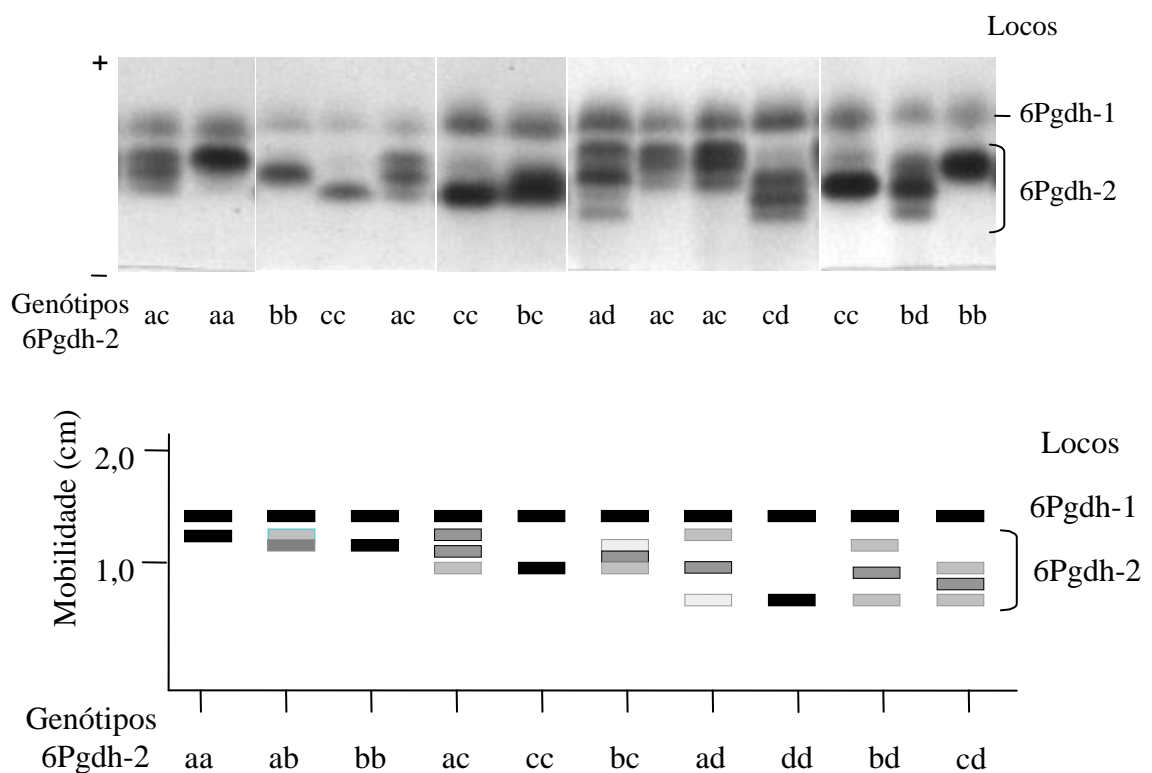


Figura 4 - Padrão isoenzimático de 6-fosfogluconato desidrogenase em sementes de *Parapiptadenia rigida* e representação esquemática dos possíveis fenótipos para este sistema, com interpretação genotípica para o loco polimórfico 6Pgdh-2.

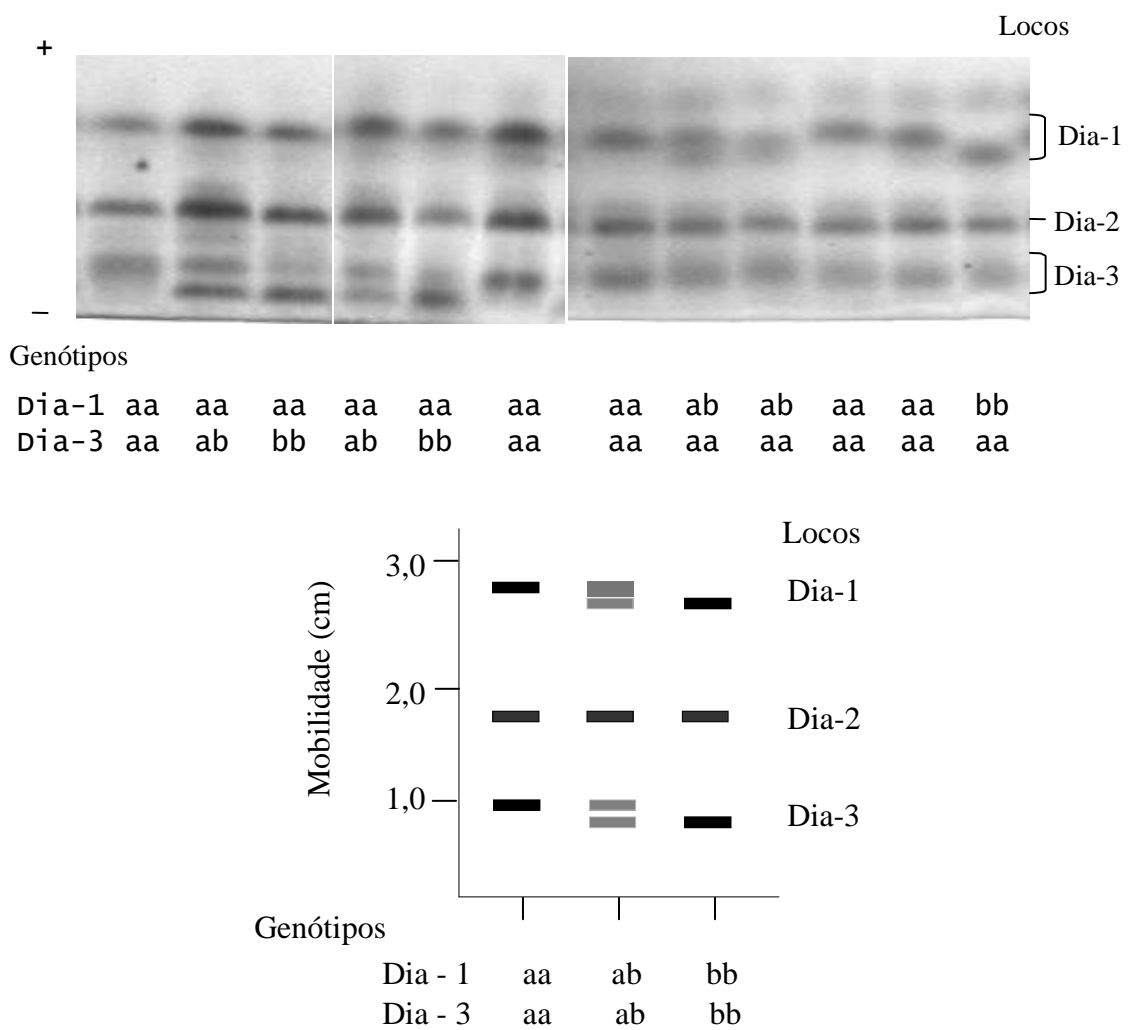


Figura 5 - Padrão isoenzimático de diaforase em sementes de *Parapiptadenia rigida*, com interpretação genotípica para os locos polimórficos Dia-1 e Dia-3 e representação esquemática dos genótipos interpretados para os locos polimórficos Dia-1 e Dia-3.

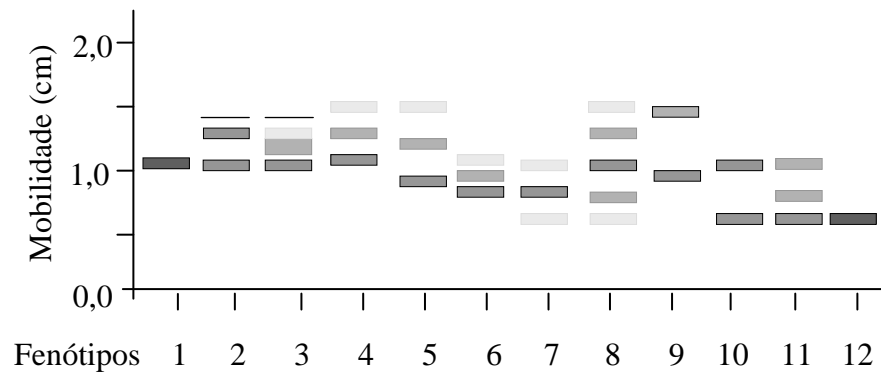


Figura 6 - Fenótipos isoenzimáticos de álcool desidrogenase em sementes de *Parapiptadenia rigida*.

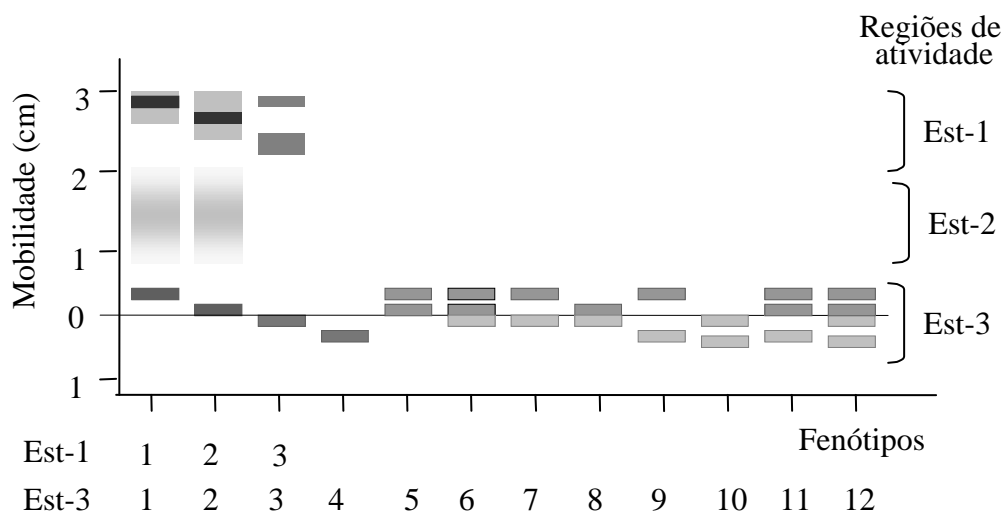


Figura 7 - Fenótipos isoenzimáticos de esterase em sementes de *Parapiptadenia rigida*.

A terceira região anódica, e de menor mobilidade, mostrou atividade associada à região catódica, tendo sido analisadas como uma única região.

A região de maior mobilidade (Est-1) apresentou três padrões polimórficos. Para o padrão 1, voltou-se a atenção para uma banda mais ativa em região mais superior do loco, o que permitiu a diferenciação deste padrão com o segundo. O padrão 3 diferenciou-se claramente, por causa de uma banda de atividade estável, localizada na base da região.

Analisando as regiões anódica e catódica mais próximas da origem e que apresentaram atividade associada como uma única região de atividade (Est-3), distinguiram-se 12 padrões de bandas, sendo quatro deles correspondentes a padrões de alelos em homozigose. Todos os diferentes padrões foram encontrados na coleção regional e no pomar de sementes. A interpretação desta região foi dificultada pela instabilidade na distância de migração e da atividade das bandas e pela proximidade entre as mesmas. Por isto, optou-se por não prosseguir com uma interpretação genotípica para esta região de atividade, nos zimogramas desta enzima.

3.2. Variabilidade genética

3.2.1. Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas de todas as famílias da coleção regional e do pomar (Quadros 1 e 2) demonstram a presença dos mesmos alelos para os quatro locos avaliados. Analogamente, as frequências dos alelos de cada loco foram semelhantes entre a coleção regional e o pomar, com predomínio do alelo b no loco Sod-2, do alelo a nos locos Dia-1 e Dia-3 e do alelo c no loco Pgdh-2. O loco Dia-3 foi o que apresentou as frequências menos divergentes. Os alelos a e b de Sod-2 foram, respectivamente, o mais raro (0,33%) e o mais

freqüente (97,83%) na coleção regional, enquanto no pomar o mais freqüente foi o alelo a do loco Dia-1 (90,75%) e o mais raro, o alelo c de Sod-2 (4,67%).

Os locos Sod-2 e Dia-3 apresentaram redução na freqüência dos alelos mais comuns no pomar. Por outro lado, no loco Pgdh-2, observou-se um pequeno aumento na freqüência do alelo c.

No pomar de sementes observaram-se as classes genóticas aa e ac para o loco Sod-2, enquanto não se observou o genótipo cc para este loco em nenhuma das amostras (Quadro 2). Nesse loco, percebe-se que a tendência à fixação do alelo b na coleção regional foi amenizada pelo processo de recombinação gênica, estimulada no pomar. Diferentemente, em Pgdh-2 o genótipo ad não foi observado no pomar e a freqüência aumentou para o genótipo cc. Também em Dia-1, percebeu-se pequeno aumento nas freqüências dos genótipos homozigotos, em conseqüência da redução de heterozigotos. O loco com maior proporção de genótipos heterozigotos foi o Dia-3 e o com mais homozigotos foi o Sod-2.

Quadro 1 - Freqüências médias dos 11 alelos observados na coleção regional e no pomar de sementes de *Parapiptadenia rigida*

Locos	Alelos	Coleção Regional	Pomar de Sementes	Média
Sod-2	1	0,0033	0,0492	0,0263
	2	0,9783	0,9040	0,9411
	3	0,0183	0,0467	0,0325
	N	599	600	1199
Dia-1	1	0,9071	0,9075	0,9073
	2	0,0928	0,0925	0,0926
	N	598	600	1198
Dia-3	1	0,6217	0,6881	0,6572
	2	0,3783	0,3118	0,3427
	N	506	582	1088
6Pgdh-2	1	0,0817	0,0651	0,0734
	2	0,0842	0,0526	0,0422
	3	0,8125	0,8548	0,8336
	4	0,0217	0,0242	0,0229
	N	600	597	1197

Quadro 2 - Frequências genotípicas observadas na coleção regional e no pomar de sementes para *Parapiptadenia rigida*

População	Genótipos	Locos				
		Sod-2	Dia-1	Dia-3	Pgdh-2	
Natural	aa	--	0,8200	0,3900	0,0050	
	ab	0,0067	0,1684	0,4117	0,0150	
	bb	0,9567	0,0084	0,0417	0,0134	
	ac	--			0,1350	
	cc	--			0,6634	
	bc	0,0367			0,1250	
	cd				0,0384	
	ad				0,0034	
	bd				0,0017	
	dd				--	
	**			0,0034	0,1567	
	Pomar	aa	0,0067	0,8367	0,4350	0,0169
ab		0,0750	0,1417	0,4650	0,0034	
bb		0,8234	0,0217	0,0700	0,0017	
ac		0,0100			0,1035	
cc		--			0,7334	
bc		0,0834			0,0935	
cd					0,0434	
ad					--	
bd					0,0050	
dd					--	
**		0,0017		0,0300	0,0034	

** Frequências de genótipos não-interpretáveis.

3.2.2. Estimativas dos parâmetros de variabilidade genética

As médias de número de alelos por locos polimórficos, a porcentagem de locos polimórficos e as heterozigosidades observada e esperada para o pomar apresentaram uma pequena vantagem em relação à coleção regional (Quadro 3). No entanto, as diferenças entre as estimativas obtidas para os parâmetros, nas duas populações, não foram significativas pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Para número de alelos, as médias variaram de 1,3 a 2,8 (famílias 28 e 11, respectivamente) e a estimativa obtida para o pomar foi de 2,0833 alelos. Já na

Quadro 3 - Variabilidade genética medida pelo número médio de alelos por loco polimórfico (A), porcentagem de locos polimórficos (P) e heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e), obtidas para as duas populações experimentais de *Parapiptadenia rigida*

Populações	Parâmetros			
	$\hat{A}^{(1)}$	$\hat{P}^{(2)}$	\hat{H}_o	\hat{H}_e
Natural	1,9300 (0,2830)	65,0000 (21,3751)	0,2599 (0,1376)	0,2150 (0,0960)
Pomar	2,0833 (0,3291)	73,3334 (20,6920)	0,2596 (0,1064)	0,2276 (0,0830)

1 - Valores entre parenteses correspondem aos desvios-padrões

2 - Um loco é considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum não exceder 0,95.

coleção regional, o número de alelos foi de 1,93, tendo a estimativa mais alta sido de 2,3 (famílias 2, 7, 9, 10, 22 e 29), enquanto a mais baixa se manteve com 1,3 alelo (família 14).

As famílias 21 e 28 do pomar mostraram-se monomórficas para três dos quatro locos avaliados, enquanto para a coleção regional foram observadas quatro (14, 16, 23, 25). Sete famílias no pomar e três na coleção regional apresentaram 100% dos locos polimórficos.

O loco Sod-2 apresentou o maior número de famílias monomórficas, com oito famílias no pomar e 20 famílias na coleção regional, todas para o genótipo bb. Para o loco Pgdh-2, encontraram-se quatro e cinco famílias monomórficas para o genótipo cc, respectivamente, para ambas as populações. O loco Dia-3 apresentou apenas um caso de família monomórfica na coleção regional e nenhum no pomar. No entanto, para o loco Dia-1 no pomar, foi amostrado o dobro de famílias monomórficas para o genótipo aa, em relação às cinco famílias da coleção regional.

Quanto à proporção de heterozigotos observados, a família 28 do pomar apresentou apenas 9% de genótipos heterozigotos, enquanto a família 11 apresentou 46%. Na coleção regional, o mínimo foi de 2% (família 16) e o

máximo de 54% (família 2). Como média de genótipos heterozigotos, estimaram-se 25,96% para o pomar de sementes e 25,99% para a coleção regional.

O pomar de sementes apresentou 22,76% de heterozigosidade média esperada e a coleção regional apresentou 21,50%. Estas médias foram obtidas de valores entre 0,07 e 0,37 e entre 0,02 e 0,42, para o pomar e para a coleção regional, respectivamente.

3.2.3. Variabilidade pelo índice de diversidade de Shannon-Weaver (H')

As estimativas médias de H' , obtidas para os locos Adh, Est-3, Dia-1, Dia-3 e 6Pgdh-2, não apresentaram diferenças significativas entre as populações (Figura 7). O loco Sod-2 apresentou estimativa média maior para o pomar, enquanto o loco Est-1 teve a média da coleção regional maior que a do pomar de sementes.

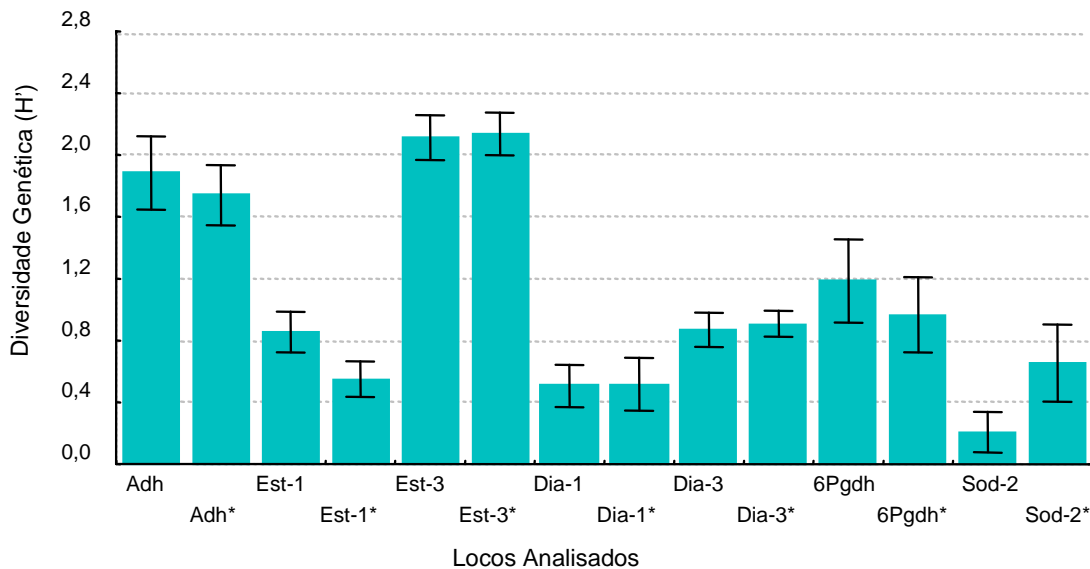
O H' normalizado de 0,4265 para a coleção regional é a média das estimativas dos locos, as quais variaram de 0,5892 (loco Est-3) a 0,0891 (Sod-2). A média no pomar de 0,4242 foi obtida de estimativas que variaram de 0,5958 a 0,2817, para os mesmos locos (Quadro 4).

Quadro 4 - Estimativas de H' por loco isoenzimático, para a coleção regional e para o pomar de sementes de *Parapiptadenia rigida*

Locos	Coleção Regional			Pomar de Sementes		
	H'	H'^a	VH'^b	H'	H'^a	VH'^b
Adh	1,8844	0,5257	0,3997	1,7391	0,5235	0,2729
Est-1	0,8557	0,5399	0,1237	0,5505	0,3474	0,0954
Est-3	2,1123	0,5892	0,1532	2,1359	0,5958	0,1354
Dia-1	0,5062	0,3194	0,1340	0,5159	0,3255	0,2087
Dia-3	0,8693	0,5483	0,0893	0,9078	0,5728	0,0509
6Pgdh-2	1,1847	0,3737	0,5199	0,9672	0,3224	0,4237
Sod-2	0,2069	0,0891	0,1243	0,654	0,2817	0,4491
Média	1,0885	0,4265		1,0672	0,4242	

a Estimativas de H' ajustadas para o intervalo entre 0 e 1.

b Variância da estimativa obtida pela técnica de Jackknife, tendo loco como unidade de reamostragem.



* Pomar de sementes.

Figura 7 - Estimativas não-ajustadas de H' por loco isoenzimático, para o pomar de sementes e para a coleção regional de *Parapiptadenia rigida*, sendo apresentados os limites de confiança para cada estimativa.

3.3. Sistema de cruzamento

3.3.1. Testes das pressuposições do modelo de cruzamento misto

A existência de associação entre os locos foi avaliada pelo teste qui-quadrado, em tabelas de contingência, segundo O'MALLEY et al. (1988). Os resultados demonstraram a associação entre os locos Dia-1 e Dia-3, a 1% de probabilidade (Quadro 5). Os menores valores de probabilidade que indicaram locos não-ligados foram 30,32% para Dia-3 e 6Pgdh-2 e 33% para Pgdh-2 e Dia-1.

Quadro 5 - Resultados do teste qui-quadrado (χ^2) aplicado em tabelas de contingência, para análise da independência dos locos 1 e 3 da diaforase (Dia-1 e Dia-3), do loco 2 da superóxido dismutase (Sod-2) e do loco 2 da 6-fosfogluconato desidrogenase (6Pgdh-2) em *Parapiptadenia rigida*

Locos Comparados	χ^2 Calculado	Grau de Liberdade	Probabilidade (%)
Dia-1 x Sod-2	2,43	4	65,64
Dia-3 x Sod-2	0,95	4	91,73
Sod-2 x 6Pgdh-2	0,57	4	96,66
Dia-1 x Dia-3	15,64	4	0,354**
Dia-1 x 6Pgdh-2	4,60	4	33,00
Dia-3 x 6Pgdh-2	4,85	4	30,32

** Significativo a 1% de probabilidade.

Por causa das limitações de aplicar o teste qui-quadrado para avaliação de frequências mínimas esperadas menores que 1, utilizou-se a combinação de alelos menos frequentes dentro de locos com mais de dois alelos (STEEL e TORRIE, 1980). Dessa forma, para o loco Sod-2, foram combinados os alelos a e c, e para o loco Pgdh-2, os alelos a, b e d.

As frequências alélicas estimadas, separadamente, para o conjunto de pólen e óvulos no pomar de sementes são significativamente diferentes nos locos Dia-3 e 6Pgdh-2, tendo como referência os desvios obtidos para as estimativas (Quadro 6). Para os locos Sod-2 e Dia-1, os alelos b e a, respectivamente, apresentaram a maior frequência entre gametas masculinos e femininos. Os alelos a, b e c, do loco 6Pgdh-2, não apresentaram diferenças significativas entre suas frequências nos gametas masculinos e femininos. No entanto, o alelo d apresentou-se com maior frequência no conjunto de pólen do que nos gametas femininos. Em Dia-3, o alelo a esteve mais frequente nos óvulos e o alelo b, nos grãos de pólen.

Quadro 6 - Frequências alélicas estimadas para o conjunto de pólen e óvulos de *Parapiptadenia rigida*, distribuídos no pomar de sementes

Loco / Alelo	Frequências				
	Pólen*		Óvulos*		
Sod-2	a	0,033	(0,012)	0,050	(0,029)
	b	0,894	(0,021)	0,917	(0,035)
	c	0,072	(0,017)	0,033	(0,023)
Dia-1	a	0,906	(0,020)	0,917	(0,034)
	b	0,094	(0,020)	0,083	(0,034)
Dia-3	a	0,596	(0,052)	0,750	(0,055)
	b	0,404	(0,052)	0,250	(0,055)
6Pgdh-2	a	0,071	(0,017)	0,067	(0,030)
	b	0,035	(0,011)	0,083	(0,034)
	c	0,860	(0,023)	0,833	(0,050)
	d	0,034	(0,009)	0,017	(0,013)

(*) Valores entre parênteses correspondem ao desvio-padrão das frequências alélicas estimadas.

O teste qui-quadrado para avaliar os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a coleção regional e o pomar de sementes, foi aplicado, comparando-se as frequências observadas às esperadas dos genótipos nos locos

Sod-2, Dia-1, Dia-3 e 6Pgdh-2. As análises dos locos Sod-2, Dia-1 e Dia-3, resultantes das famílias do pomar, indicaram que as distribuições genotípicas estão fora do esperado, sob condição de equilíbrio (Quadro 7). Os locos Sod-2 e Dia-1 apresentaram desvios no pomar em virtude do excesso de homozigotos para o alelo menos freqüente e para o mais freqüente. As freqüências genotípicas para o loco Dia-3 estão mais distantes das freqüências esperadas, por excesso de heterozigotos no pomar.

Como resultado do teste qui-quadrado aplicado para verificar a homogeneidade no número de sementes heterozigotas entre famílias com genótipo materno homozigoto para o mesmo loco, para o pomar de sementes, os locos Dia-3 e 6Pgdh-2 indicaram, a 1% de probabilidade, que o conjunto de pólen não é distribuído de forma homogênea sobre o pomar (Quadro 8).

3.3.2. Estimativas dos parâmetros do sistema de cruzamento

Dadas às freqüências alélicas no pomar, juntamente com os valores iniciais sugeridos para os parâmetros, foram obtidas as estimativas dos parâmetros do sistema de cruzamento, assim como os desvios-padrão obtidos de 100 “bootstraps” (Quadro 9).

As estimativas calculadas com o uso de quatro e três locos (excluindo o Dia-3) apresentaram diferença considerável apenas para o parâmetro r_p , sendo esta de 0,201 quando estimada com quatro locos e 0,140, com três locos. Os valores do coeficiente de endogamia de Wright (F) e da diferença entre as taxas de fecundação cruzada multilocos e unilocos ($t_m - t_s$) foram próximo a zero, com 0,005 e 0,028, respectivamente, considerando quatro locos enzimáticos. Para t_m e t_s , foram estimados 0,948 e 0,920 para a população, indicando alta taxa de fecundação cruzada. As estimativas de 0,194 e 0,201 para r_t e r_p , respectivamente, indicam ocorrência de cruzamentos correlacionados.

Quadro 7 - Teste qui-quadrado (χ^2) para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando as frequências observadas (Fo) e esperadas (Fe) de 11 alelos e quatro locos na coleção regional e no pomar de sementes de *Parapiptadenia rigida*

Locos	Classes ^a	Coleção Regional			
		Fo	Fe	χ^2	Probabilidade (%)
Sod-2	1	574	574,28	0,29 ^{ns}	59,02
	2	26	25,48		
	3	00	0,28		
Dia-1	1	492	492,16	0,005 ^{ns}	94,36
	2	101	100,69		
	3	5	5,15		
Dia-3	1	234	252,58	15,87 ^{ns}	6,79
	2	247	209,83		
	3	25	43,58		
6Pgdh-2	1	398	396,09	0,26 ^{ns}	61,01
	2	179	182,81		
	3	23	21,09		
Pomar de Sementes					
Sod-2	1	494	489,52	4,45*	3,49
	2	95	103,97		
	3	10	5,52		
Dia-1	1	502	494,16	14,49*	1,41
	2	85	100,73		
	3	13	5,16		
Dia-3	1	261	270,23	8,13**	0,43
	2	279	247,35		
	3	42	56,60		
6Pgdh-2	1	440	429,85	1,18 ^{ns}	27,73
	2	134	136,92		
	3	14	10,97		

- a 1. número de homocigotos para o alelo mais comum.
 2. número de heterocigotos, envolvendo o alelo mais comum.
 3. número de homocigotos para o alelo raro e outros heterocigotos.
- * p < 0,05.
 ** p < 0,01.
 ns não-significativo.

Quadro 8 - Teste qui-quadrado (χ^2) para homogeneidade do número de sementes heterozigotas nas famílias com genótipo materno homozigoto para o mesmo loco, identificadas no pomar de sementes para a *Parapiptadenia rigida*

Locos	Genótipo Materno	χ^2 Calculado	GL	Probabilidade (%)
Sod-2 ⁽¹⁾	bb	47,72	23	0,18
Dia-1	aa	46,20	24	0,42
Dia-3	aa	21,15	14	9,78
6Pgdh-2 ⁽²⁾	cc	49,32	21	4,53

1 - Agruparam-se as frequências das classes genotípicas bc e ab.

2 - Agruparam-se as frequências das classes genotípicas ac, bc e cd.

Quadro 9 - Estimativas dos parâmetros calculados para o pomar, comparando-se os resultados obtidos com os quatro locos e com a exclusão do loco 3 de diaforase (Dia-3) em *Parapiptadenia rigida*

Parâmetro Estimado (*)	4 Locos	3 Locos
F	0,005 (0,001)	0,007 (0,001)
t_m	0,948 (0,028)	0,923 (0,039)
t_s	0,920 (0,016)	0,901 (0,025)
t_m-t_s	0,028 (0,017)	0,022 (0,018)
r_t	0,194 (0,006)	0,191 (0,005)
r_p	0,201 (0,028)	0,140 (0,021)

(*) Valores entre parênteses correspondem ao desvio-padrão da estimativa do parâmetro.

Os valores do logaritmo natural das probabilidades de verossimilhança dos parâmetros estimados para o pomar (Quadro 10) indicam que a inclusão do loco Dia-3 nas análises causou diminuição do ajuste dos dados à equação de máxima verossimilhança (RITLAND, 1990).

Os genótipos maternos, para cada árvore amostrada do pomar, foram estimados com base nas frequências genotípicas observadas em cada família de 20 sementes coletada em 1997 (Quadro 11).

A proporção de genótipos heterozigotos (ab) estimada em Dia-3 para as árvores aproxima-se de 50%, ocorrendo apenas o genótipo aa como homozigoto.

Quadro 10 - Logaritmo natural das probabilidades de verossimilhança dos parâmetros estimados para o pomar de sementes de *Parapiptadenia rigida*

Parâmetros	4 Locos	3 Locos
F	-84,539	-61,166
t_m	-1458,909	-968,451
r	-27651,650	-18389,660

No loco Sod-2, o genótipo bb predominou entre as árvores, seguido pela ocorrência de apenas três genótipos ab (famílias 3, 11 e 29) e dois bc (famílias 13 e 23). Em Dia-1, apenas as famílias 2, 4, 13, 18 e 24 apresentaram o genótipo ab, sendo todas as outras aa para este loco, portanto, não ocorreu genótipo materno em homozigose para o alelo b.

Cinco genótipos diferentes para 6Pgdh-2 foram encontrados dentre as 30 famílias amostradas no pomar. Apenas a família 14 apresentou o alelo d (genótipo cd); a família 1 é a única com o genótipo ab, devendo-se ressaltar que o alelo b está presente em outras quatro famílias em genótipo bc (famílias 5, 17, 23 e 25) e o alelo a ocorre novamente como ac em outras três famílias (9, 12 e 18).

3.4. Análise dos frutos

As frequências alélicas observadas nas famílias das nove árvores coletadas em 1998 (Quadro 12) apresentaram um padrão semelhante ao observado nas famílias de todo o pomar de sementes (Quadro 1).

As estimativas dos parâmetros de cruzamento para as nove famílias (Quadro 13) seguiram a mesma tendência que as estimativas obtidas com maior amostragem no pomar (Quadro 9). No entanto, as estimativas de F e t_m-t_s tornaram-se ainda mais próximo de zero e as estimativas de t_m e t_s foram maiores,

Quadro 11 - Genótipos mais *prováveis* estimados para cada árvore de *Parapiptadenia rigida*, com base nas frequências genotípicas observadas nas progênes no pomar

Família	Locos			
	Sod-2	Dia-1	Dia-3	6Pgdh-2
fa01	b b	a a	a a	a b
fa02	b b	a b	a a	c c
fa03	a b	a a	a b	c c
fa04	b b	a b	a a	c c
fa05	b b	a a	a a	b c
fa06	b b	a a	a b	c c
fa07	b b	a a	a a	c c
fa08	b b	a a	a b	c c
fa09	b b	a a	a a	a c
fa10	b b	a a	a b	c c
fa11	a b	a a	a a	c c
fa12	b b	a a	a b	a c
fa13	b c	a b	a b	c c
fa14	b b	a a	a b	c d
fa15	b b	a a	a b	c c
fa16	b b	a a	a a	c c
fa17	b b	a b	a b	b c
fa18	b b	a a	a b	a c
fa19	b b	a a	a b	c c
fa20	b b	a a	a a	c c
fa21	b b	a a	a b	c c
fa22	b b	a a	a a	c c
fa23	b c	a a	a a	b c
fa24	b b	a b	a b	c c
fa25	b b	a a	a a	b c
fa26	b b	a a	a b	c c
fa27	b b	a a	a a	c c
fa28	b b	a a	a a	c c
fa29	a b	a a	a a	c c
fa30	b b	a a	a b	c c

Quadro 12 - Frequências alélicas médias das famílias de nove árvores de *Parapiptadenia rigida* do pomar, na coleta de 1998

Alelos	Locos			
	Sod-2	Dia-1	Dia-3	6Pgdh-2
a	0,0557	0,9227	0,7067	0,0919
b	0,8899	0,0772	0,2933	0,1149
c	0,0543			0,7622
d				0,0311

Quadro 13 - Estimativas de F , t_m , t_s , r_t e r_p obtidas para as árvores de *Parapiptadenia rigida* amostradas em 1998, comparando-se os resultados com a exclusão do loco três da diaforase (Dia-3)

Parâmetro Estimado (*)	4 Locos	3 Locos
F	0,002 (0,001)	0,001 (0,000)
t_m	0,995 (0,016)	0,997 (0,016)
t_s	0,978 (0,007)	0,980 (0,010)
t_m-t_s	0,017 (0,011)	0,017 (0,008)
r_t	0,188 (0,021)	0,194 (0,011)
r_p	0,515 (0,063)	0,289 (0,059)

(*) Valores entre parênteses correspondem ao desvio-padrão do parâmetro estimado.

aproximando-se ainda mais de 1. Em virtude da amostragem não ao acaso das sementes dentro das árvores, as estimativas para r_p , considerando quatro e três locos, respectivamente, elevaram-se para 0,515 ou 0,289, indicando alta correlação nos cruzamentos para a amostragem de 1998.

Os valores do logaritmo natural das probabilidades de verossimilhança dos parâmetros (Quadro 14) são maiores que os encontrados em 1997, somente em relação a r (Quadro 10).

Como está demonstrado no Quadro 15, ocorreram diferenças entre as frequências alélicas no pólen e nos óvulos. Estas diferenças, provavelmente, são justificadas pelo fato de os grãos de pólen não terem representado uma amostragem ao acaso dos alelos presentes na população, visto que cada políade contém grãos de pólen

de um único indivíduo, e estes polinizam para formação das sementes do mesmo fruto.

Quadro 19 - Logaritmo natural das probabilidades de verossimilhança dos parâmetros estimados para a amostra de *Parapiptadenia rigida* coletada no pomar de sementes, em 1998

Parâmetros	4 Locos	3 Locos
F	-33,264	-24,571
tm	-961,716	-710,481
r	-33390,820	-29615,030

Quadro 15 - Frequências alélicas estimadas distintamente para o conjunto de pólen e óvulos nas nove famílias de *Parapiptadenia rigida* amostradas no pomar de sementes, em 1998

Loco / Alelo (*)		Locos	
		Pólen	Óvulos
Sod-2	a	0,017 (0,015)	0,111 (0,055)
	b	0,939 (0,034)	0,778 (0,072)
	c	0,044 (0,032)	0,111 (0,055)
Dia-1	a	0,846 (0,036)	0,947 (0,003)
	b	0,154 (0,036)	0,053 (0,003)
Dia-3	a	0,714 (0,038)	0,667 (0,097)
	b	0,286 (0,038)	0,333 (0,097)
Pgdh-2	a	0,059 (0,038)	0,167 (0,075)
	b	0,088 (0,034)	0,111 (0,064)
	c	0,835 (0,051)	0,667 (0,105)
	d	0,017 (0,016)	0,056 (0,028)

(*) Valores entre parênteses correspondem ao desvio-padrão das frequências alélicas estimadas.

Os alelos mais frequentes na população são também mais frequentes nos óvulos e nos grãos de pólen, mas as frequências alélicas nos grãos de pólen e nos

óvulos diferiram entre si, numa proporção maior do que no caso das 30 famílias coletadas em 1997. Os alelos mais comuns se apresentaram em frequências mais elevadas em todos os quatro locos, e mesmo o loco Dia-3 apresentou elevação na proporção do alelo a.

Os genótipos mais prováveis estimados para cada árvore são apresentados no Quadro 16. Estes genótipos foram estimados ao considerar os quatro frutos da mesma árvore como uma única família, ou seja, a árvore é a unidade de observação.

Foram estimados três diferentes genótipos maternos dentre as nove estimativas para Sod-2, três genótipos para Dia-3, cinco diferentes genótipos para o loco 6Pgdh-2 e apenas o genótipo aa para Dia-1.

Dados aos genótipos obtidos da análise de eletroforese para os locos Dia-1, Dia-3, Sod-2 e 6Pgdh-2 e considerando os genótipos maternos definidos pelo MLTR, para as nove árvores, relacionaram-se os genótipos paternos mais prováveis para cada fruto amostrado em 1998 (Quadro 16). Os genótipos paternos foram obtidos ao considerar que todas as sementes, ou a maioria contida em cada fruto, foram originadas pela fecundação dos óvulos por grãos de pólen contidos em uma única políade.

Com base nos genótipos paternos estimados para cada fruto, pode-se inferir diretamente a ocorrência de fecundação cruzada para os frutos que receberam alelos diferentes daqueles doados pela mãe. Desta forma, todos os frutos das árvores 1, 3, 4, 5 e 8 foram resultantes de fecundação cruzada. Apenas nos casos A2/2, A6/1, A7/3 e A9/2, os frutos não garantem a ocorrência de fecundação cruzada. Foi confirmada, sem possibilidade de ambigüidade, a ocorrência de fecundação cruzada para 29 dos 33 frutos analisados (87,88%).

Os mesmos frutos que não apresentaram confirmação para ocorrência de fecundação cruzada também não indicaram certeza de autopolinização, em virtude da possibilidade de as políades com alelos semelhantes aos da árvore-mãe serem originadas de outra árvore com os mesmos alelos.

Como resultados da paternidade múltipla para o mesmo fruto, dos três testes aplicados, o teste que avalia a presença de mais de dois alelos no conjunto de pólen não detectou nenhum caso de paternidade múltipla. O teste que considera a presença de mais de oito cópias parentais de um mesmo tipo de alelo, em um loco segregante, indicou que dez dos 33 frutos (30%) possuíam sementes resultantes da polinização dos óvulos por mais de uma políade (Quadro 17).

Dos frutos indicados por esse teste, três são da árvore 1, um das árvores 2, 3, 7 e 8 e outros dois da árvore 9. De todos os frutos relacionados, apenas os dois frutos da árvore 9 tiveram a confirmação por dois locos distintos (Dia-3 e Sod-2), enquanto os outros foram indicados apenas por Dia-1 ou Dia-3.

Para o teste da segregação multilocos, apenas dois frutos indicaram paternidade múltipla, sendo confirmada a significância pelo teste qui-quadrado a 1% de probabilidade, e outros três frutos, quando se considera a probabilidade a 5%. A 1%, detectaram-se os frutos 2 e 3 da árvore 6, e com maior probabilidade, somaram-se o fruto 4 da árvore 3 e os frutos 2 e 3 da árvore 8.

Dessa forma, apenas os frutos 4 da árvore 3, o 3 da árvore 8 e o 3 da árvore 6 foram detectados para paternidade múltipla por dois testes simultaneamente, envolvendo os mesmos locos na confirmação dos resultados. No entanto, em nenhum caso, teve-se a confirmação da paternidade múltipla pelo teste de mais de dois alelos diferentes, recebidos do conjunto de grãos de pólen.

3.5. Germinação das sementes

As médias e os desvios-padrão do total de sementes germinadas, sendo calculados sobre o total acumulado por dia de germinação (Quadro 18), demonstram que, com exceção do segundo dia, a germinação foi mais vigorosa para as famílias do pomar do que para as da coleção regional. No entanto, no segundo dia de germinação, a coleção regional apresentou maior proporção de sementes germinadas.

Os desvios-padrão mantiveram-se maiores para o pomar apenas no primeiro e segundo dias de germinação, tendo, para o quarto e quinto dias, a coleção regional apresentado variação de germinação entre suas famílias muito maior. As Figuras 8 e 9 ilustram bem a proporção de germinação total e a variação da germinação entre as famílias da coleção regional e as do pomar de sementes.

A proporção de germinação das sementes foi mais expressiva no segundo e terceiro dias. As famílias 1, 7, 8, 12, 13, 14 e 15 do pomar e as famílias 27 e 30 da coleção regional tiveram sementes mais vigorosas quanto à velocidade de germinação, tendo apresentado acima de 20% de sementes germinadas já no primeiro dia do teste, sendo concluída toda a germinação com três dias. Por outro lado, as famílias 2, 19, 21, 25 e 26 do pomar concentraram maior proporção de sementes germinadas nos terceiro e quarto dias.

Quadro 16 - Genótipo materno e o mais simples genótipo paterno para cada fruto individual amostrado, em 1998, de árvores de *Parapiptadenia rigida* localizadas no pomar de sementes

Árvore / Vagem		Genótipos				N
		Sod-2	Dia-1	Dia-3	Pgdh-2	
A1	mãe	Bb	aa	aa	ab	54
A1 / 1	pai	Bb	ab	bb	cc	13
A1 / 2	pai	Bb	ab	ab	bc	15
A1 / 3	pai	Bb	ab	aa	cc	15
A1 / 4	pai	Bb	aa	ab	bc	11
A2	mãe	Bb	aa	ab	cc	41
A2 / 1	pai	Bb	ab	ab	cc	16
A2 / 2	pai	Bb	aa	aa	cc	11
A2 / 3	pai	Bc	ab	aa	cc	14
A3	mãe	Ab	aa	aa	cc	40
A3 / 1	pai	Ab	aa	ab	cc	12
A3 / 2	pai	Bb	aa	ab	bc	10
A3 / 3	pai	Bb	aa	ab	cc	6
A3 / 4	pai	Bb	ab	ab	cc	12
A4	mãe	Bb	aa	ab	ac	33
A4 / 1	pai	Ab	aa	ab	cc	12
A4 / 2	pai	Bb	ab	ab	bc	8
A4 / 3	pai	Bb	ab	ab	bc	13
A5	mãe	Bb	aa	bb	cd	26
A5 / 1	pai	Ab	aa	ab	cc	8
A5 / 2	pai	Bb	aa	ab	cc	10
A5 / 3	pai	Bb	ab	aa	cc	8
A6	mãe	Bc	aa	ab	bc	46
A6 / 1	pai	Cc	aa	aa	cc	11
A6 / 2	pai	Bb	aa	ab	ac	11
A6 / 3	pai	Bc	aa	ab	ac	15
A6 / 4	pai	Bb	aa	ab	cc	9
A7	mãe	Bc	aa	aa	cc	44
A7 / 1	pai	Bb	ab	ab	cc	14
A7 / 2	pai	Bb	ab	ab	cc	10
A7 / 3	pai	Bb	aa	aa	cc	9
A7 / 4	pai	Bb	ab	ab	cc	11
A8	mãe	Bb	aa	ab	cc	47
A8 / 1	pai	Bb	ab	aa	cc	12
A8 / 2	pai	Bb	ab	ab	bc	10
A8 / 3	pai	Bb	ab	aa	13	14
A8 / 4	pai	Bb	ab	ab	34	11
A9	mãe	Ab	aa	aa	ac	42
A9 / 1	pai	Bc	aa	ab	cc	11
A9 / 2	pai	Bb	aa	(*)	cc	5
A9 / 3	pai	Bc	aa	ab	cc	15
A9 / 4	pai	Bb	aa	ab	cc	11

(*) Dados faltantes para o loco Dia-3 na família inteira.

N Número de sementes contidas no fruto analisado.

Quadro 17 - Resultados dos testes de paternidade múltipla, sendo D1, D3, S e P os locos 1 e 3 da diaforase, o loco 2 da superóxido dismutase e o loco 2 da 6-fosfogluconato desidrogenase

Famílias	Frutos	+ de 2 Alelos ^a					Testes Aplicados	
		S	D1	D3	P	Segregação Multilocos ^b	+ de 8 Alelos ^c	
A1	1	b	ab	b	c	+	ok	
	2	b	ab	ab	bc	d1 - d3	Dia-1	
						d3 - p		
	3	b	ab	a	c	+	Dia-1	
A2	4	b	a	ab	bc	d3 - p	Dia-3	
	1	b	ab	ab	c	d1 - d3	Dia-1	
	2	b	a	a	c	+	ok	
	3	bc	ab	a	c	s - d1	ok	
A3	4	--	--	--	--	--	--	
	1	ab	a	ab	c	s - d3	ok	
	2	b	a	ab	bc	d3 - p	ok	
	3	b	a	ab	c	+	ok	
A4	4	b	ab	ab	c	d1 - d3*	Dia-3	
	1	ab	a	ab	c	s - d3	ok	
	2	b	ab	ab	bc	d1 - d3	ok	
						d1 - p		
A5	3	--	--	--	--	d3 - p	--	
	4	b	ab	ab	bc	+	ok	
	1	b	a	ab	c	+	ok	
	2	b	a	ab	c	+	ok	
A6	3	--	--	--	--	--	--	
	4	b	ab	a	c	+	ok	
	1	c	a	a	c	+	ok	
	2	b	a	ab	ac	d3 - p**	ok	
A7	3	bc	a	ab	ac	s - d3**	Dia-3	
	4	b	a	ab	c	s - p		
						d3 - p**		
	1	b	ab	ab	c	+	ok	
A8	2	b	ab	ab	c	d1 - d3	Dia-1	
						d1 - d3	ok	
	3	b	a	a	c	+	ok	
	4	b	ab	ab	c	d1 - d3	ok	
A9	1	b	ab	a	c	+	ok	
	2	b	ab	ab	bc	d1 - p*	ok	
						d1 - d3		
	3	b	ab	a	ac	d3 - p	Dia-1	
A9	4	b	ab	ab	cd	d1 - p*	Dia-1	
						d1 - p	ok	
						d3 - p		
						d1 - d3		
A9	1	bc	a	ab	c	s - d3	ok	
	2	b	a	--	c	+	ok	
	3	bc	a	ab	c	s - d3	Dia-3	
	4	b	a	ab	c	+	Sod-2	

^a Prováveis alelos recebidos do conjunto de pólen.

^b Locos confrontados para aplicação do teste.

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% de probabilidade.

d1 = Dia-1, d3 = Dia-3, p = 6Pgdh-2 e s = Sod-2.

^c Locos que apresentaram resultado positivo para paternidade múltipla.

-- Frutos sem sementes viáveis ou sem interpretação.

+ Não-testado, por não envolver mais de um loco recebendo dois alelos.

Quadro 18 - Médias e desvios-padrão do número de sementes germinadas de *Parapiptadenia rigida*, calculados por dia de germinação, separadamente, para a coleção regional e para o pomar de sementes

Dias de Germinação	Pomar de Sementes	Coleção Regional
	Média (desvio-padrão)	Média (desvio-padrão)
primeiro	13,37 (24,76)	2,27 (6,89)
segundo	55,00 (29,81)	62,10 (25,12)
terceiro	78,50 (20,34)	73,80 (20,36)
quarto	89,07 (9,56)	74,70 (20,97)
quinto	92,40 (6,71)	75,23 (21,15)

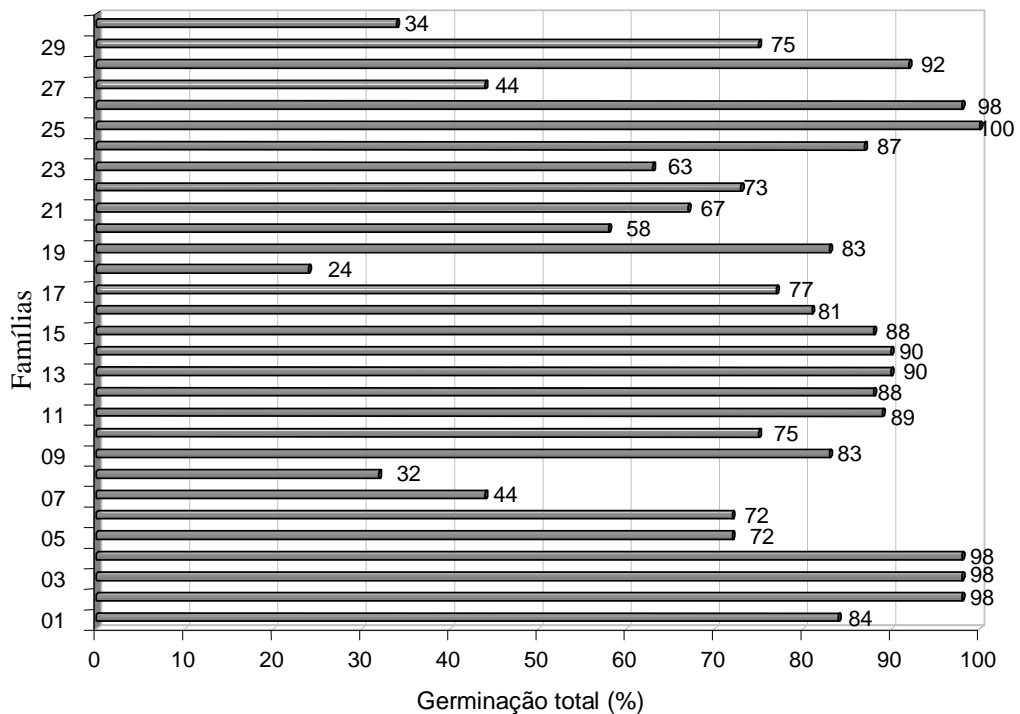


Figura 8 - Proporção de germinação por família da coleção regional, para o quinto dia de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida*.

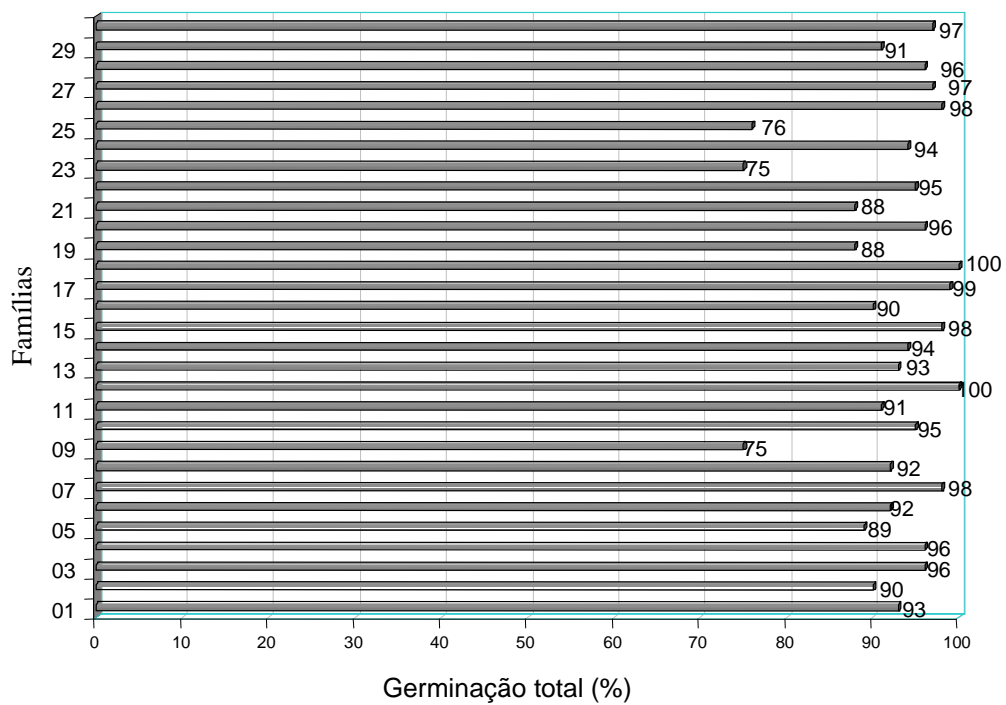


Figura 9 - Proporção de germinação por família do pomar, para o quinto dia de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida*.

4. DISCUSSÃO

4.1. Sistemas enzimáticos

Todos os ensaios foram realizados a partir da maceração de eixos embrionários, o que é considerado uma boa opção, em virtude da facilidade de obtenção das sementes e de seu armazenamento, pela elevada atividade de várias enzimas nestes tecidos e porque, normalmente, esses tecidos apresentam-se livres de metabólitos secundários, como taninos e fenóis (CHELIAK e PITEL, 1984). Além dessas vantagens, o uso de sementes facilita o controle do estágio fisiológico do tecido macerado. Sabe-se que a atividade de algumas enzimas em determinados tecidos é variável com o estágio de desenvolvimento do órgão e da planta (SCANDALIOS, 1969), o que reforçou a necessidade de ajustar e padronizar a metodologia para a espécie de interesse, segundo a qual se deve associar os possíveis tecidos utilizados para extração das enzimas ao estágio de desenvolvimento do órgão e aos tampões utilizados nos processos de maceração, eletroforese e revelação das diferentes enzimas.

Os sistemas enzimáticos utilizados neste estudo foram selecionados por apresentarem polimorfismo, atividade e resolução satisfatórios, permitindo sua interpretação genética. Dentre os cinco sistemas enzimáticos revelados, detectaram-se sete zonas de atividade polimórficas, envolvendo de dois a quatro

alelos. Destas zonas de atividade isoenzimáticas, quatro foram interpretadas geneticamente, tendo outras três sido utilizadas nas análises, pela distinção dos padrões de bandas (fenótipos), sem considerar a segregação gênica.

Em *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan, a enzima superóxido dismutase (SOD) comportou-se como dimérica e foi controlada por três locos enzimáticos. A estrutura dimérica para essa enzima concorda com as revisões de ALFENAS et al. (1991) e com os resultados de RODRIGUES (1995). A última autora, estudando procedências de urucum (*Bixa orellana* L.), detectou padrões muito semelhantes ao encontrado para angico-gurucaia, embora envolvendo apenas dois alelos no loco polimórfico.

A fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) foi polimórfica para o loco 6Pgdh-2. Neste loco, distinguiram-se quatro alelos e um padrão típico de enzima dimérica, analogamente ao encontrado em *Populus deltoides*, *P. nigra* e *P. maximowiczii* (RAJORA, 1989); *P. tremuloides* Michx. (CHELIAK e PITEL, 1984); *Pithecellobium pedicellare* Benth. (O'MALLEY e BAWA, 1987); *Eucalyptus regnans* F. Muell. (MUONA et al., 1989); e *Bixa orellana* L. (RODRIGUES, 1995).

A interpretação genética da diaforase (DIA) permitiu distinguir dois locos polimórficos para a enzima monomérica com dois alelos. Esta estrutura enzimática da DIA concorda com outros resultados obtidos com *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii*, *P. canadensis* (RAJORA, 1989) e, também, com *Bixa orellana* L. (RODRIGUES, 1995).

A enzima álcool desidrogenase (ADH) não foi interpretada geneticamente, por causa da sobreposição de locos numa mesma região de atividade. A sobreposição, ao mesmo tempo que inviabilizou a distinção de locos, permitiu reconhecer 12 fenótipos distintos. Ao contrário do que foi verificado para angico-gurucaia, em urucum (*Bixa orellana* L.) esta enzima foi monomórfica, representada por apenas uma única banda estável (RODRIGUES, 1995).

A esterase (EST) foi interpretada apenas fenotipicamente, não tendo sido visualizado um padrão lógico em nenhuma das regiões ativas nos zimogramas. Da mesma forma, na região Est-3, que envolveu enzimas de migração anódica e catódica, não ficou clara a interpretação da estrutura da enzima para a espécie. Em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, a esterase apresentou grande polimorfismo. Para três locos interpretados para esta espécie, foram definidos seis, três e quatro alelos, em padrão típico de enzima monomérica (MORI, 1993).

O uso de tampões durante as várias etapas de utilização da técnica é essencial para a manutenção da atividade enzimática. O tampão de extração utilizado durante o processo de maceração, por exemplo, é composto por eficientes agentes oxidantes e estabilizadores de atividade enzimática, que visam melhorar a resolução das isoenzimas (ALFENAS et al., 1998).

4.2. Variabilidade genética

Os pequenos e escassos fragmentos que estão distribuídos pela região podem estar alterados tanto em composição florística quanto em sua estrutura genética. As famílias que representam a coleção regional podem estar retratando subpopulações formadas pela ação da fragmentação das florestas contínuas e, ou, pela estruturação em famílias da espécie, como foi caracterizado por MARTINS (1995). Assim, a coleta de sementes de árvores ao longo da represa e de forma estratificada, com posterior utilização desse material na composição do pomar, teve o objetivo de favorecer a recombinação entre genótipos distanciados entre si, refletindo-se na produção de sementes com qualidade genética satisfatória para serem utilizadas em programas de reflorestamento.

4.2.1. Variabilidade isoenzimática

As estimativas obtidas para os parâmetros de variabilidade genética não foram significativamente diferentes entre a coleção regional e o pomar. Comparando os valores de porcentagem de locos polimórficos (73,34 e 65%), o número médio de alelos por locos polimórficos (2,07 e 1,93), a proporção de genótipos heterozigotos (0,26 e 0,27) e a heterozigosidade esperada (0,23 e 0,22), encontrados para *P. rigida* na coleção regional e no pomar de sementes, respectivamente, com os estimados para outras espécies arbóreas de florestas tropicais, observa-se alguma concordância, muito embora tais estimativas possam variar de espécie para espécie.

HAMRICK (1989), estudando a variabilidade isoenzimática de 16 taxa de espécies arbóreas tropicais, encontrou 60,9% para porcentagem de locos polimórficos e 0,211 de heterozigosidade média observada. Estudando 29 espécies arbóreas tropicais, HAMRICK e LOVELESS (1986) encontraram uma média de 27,9% de locos polimórficos, 1,45 alelo por loco polimórfico e heterozigosidade média observada de 0,111 (variando de 0,0 a 0,216). PAIVA (1992), utilizando quatro locos polimórficos e 17 alelos, estimou em 4,0 e 4,3 o número médio de alelos por loco polimórfico, 100 e 75% de locos polimórficos, 0,319 e 0,295 para heterozigosidade observada (H_o) e 0,105 e 0,130 para heterozigosidade esperada (H_e), considerando duas populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd) ex Adr. de Juss) Muell. Arg.). Segundo ele, os valores de número de alelos por locos polimórficos (A) e a proporção de locos polimórficos (P) foram altos em relação aos valores encontrados em análises desenvolvidas anteriormente, para a mesma espécie. MORAES (1992), estudando a variabilidade genética para duas populações naturais de aroeira [*Myracrodruon urundeuva* F.F.& M.F. allemão Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Enger)], estimou 2,7 e 3,0 alelos por locos, 66,7% iguais de locos polimórficos, 0,14 e 0,16 para heterozigosidade média observada e 0,356 e 0,243 de heterozigosidade média esperada.

Dentre os estudos realizados com espécies da família Leguminosae, CHAMBERLAIN et al. (1996) estudaram populações introduzidas de *Glericidia sepium* (Jacq.) Walp. e encontraram estimativas próximas às obtidas para *P. rigida*. No entanto, as estimativas médias de 1,96 alelo por loco, 59,90% de locos polimórficos e 0,238 de heterozigidade observada, encontradas para essa leguminosa, estão relativamente distantes das encontradas para 17 populações estudadas de *Calliandra calothyrsus* Meisn. na América Central e no México. Utilizando-se 23 locos, CHAMBERLAIN (1998) observou heterozigidade ($H_o = 0,057$) que variava de 0,001 a 0,115 e detectou 20,46% de locos polimórficos e 1,22 de média de alelos (de 1,04 a 1,61) para esta última espécie.

Outras populações de espécies da família Leguminosae mostraram-se bem distintas em relação a *P. rigida* e, também, a *Glericidia sepium* (Jacq.) Walp. As populações de *Acacia mangium* Willd., que de forma semelhante ao angico-gurucaia, normalmente, apresentam-se geograficamente distribuídas ao longo de ambientes ciliares e em encostas e também possuem políades, revelaram baixa diversidade genética. Suas estimativas foram de 1,14 alelo por loco, 6,67% de locos polimórficos e 0,15 de heterozigidade observada (MORAN et al., 1989).

As estimativas para A e P, diante das citações apresentadas, foram variáveis, tornando impróprias as inferências sobre a variabilidade entre diferentes espécies. Estes estimadores estão sujeitos a variações causadas por diferenças na metodologia utilizada. Por outro lado, as variações de número de locos isoenzimáticos, o grau de polimorfismo considerado (0,95 ou 0,99) e o número de alelos envolvidos na análise interferem em menor intensidade nas estimativas de heterozigidade média (TORGGLER, 1995). Desta forma, as estimativas de heterozigidade média obtidas na coleção regional e no pomar de sementes de *P. rigida* estão próximas às obtidas para as espécies que mantêm alta variabilidade em suas populações.

De modo geral, o índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') atinge maior valor quando a frequência dos alelos é igualmente distribuída, ou seja, quando os alelos são igualmente prováveis ($p_a = p_b = 0,5$). Por outro lado, quando

um alelo se torna mais frequente que o outro ($p_a > p_b$), o valor de H' diminui, chegando próximo de zero quando a frequência de um único alelo se aproxima de 1,0 (SHANNON e WEAVER, 1964).

JAIN et al. (1975), estudando a diversidade em coleções de trigo (*Triticum turgidum* L.) de várias regiões de diferentes países, encontraram uma amplitude de diversidade do índice de 0,87 a 0,39. SILVEIRA et al. (1997), trabalhando com diferentes acessos de uma espécie de gramínea forrageira (*Brumus auleticus* Trinius), encontraram valores mais baixos, variando de 0,00 a 0,46.

CHAMBERLAIN et al. (1996) também utilizaram o H' para avaliar os dados de polimorfismo isoenzimático para *Glericidia sepium* (Jacq.) Walp., com base em oito locos. Os autores encontram valores de 0,416 e 1,355 como amplitude para as oito populações amostradas.

Esse índice é normalmente utilizado para avaliar características fenotípicas. O índice não é adequado para se comparar variabilidade genética entre espécies, portanto, as comparações entre os diferentes resultados apresentados não devem ser feitas.

4.2.2. Variabilidade entre populações

As estimativas obtidas para A , P , H_o , H_e e H' indicaram não existir diferença genética entre as duas populações experimentais de *P. rigida*. O mesmo foi verificado para populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd) ex Adr. de Juss) Muell. Arg.) (PAIVA, 1992) e aroeira (*Myracrodruon urundeuva* F.F.& M.F. allemão Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Enger) (MORAES, 1992), tendo sido encontradas estimativas correspondentes, como já citado. No entanto, alguns detalhes da metodologia utilizada na amostragem das populações e, também, na seleção das sementes para análise eletroforética podem ter influenciado os resultados do presente trabalho.

A estrutura espacial dos indivíduos que compõem o pomar de sementes é certamente diferente da coleção regional. A espécie analisada possui dispersão de sementes facilitada pelo vento (sementes aladas), no entanto, as sementes não se distanciam muito da árvore-mãe. SHAW e ALLARD (1982) verificaram, para *Pseudotsuga menziesii* var. “menziesii”, e MUONA et al. (1989), para *Eucalyptus regnans* F. Muell., que esse processo condiciona a formação de grupos aparentados, favorecendo a endogamia por cruzamento entre indivíduos aparentados. Esta estrutura com tendência à agregação foi verificada para coleção regional de *Parapiptadenia rigida*, por MARTINS (1995). Já no pomar de sementes, a época de plantio das mudas, a distribuição espacial dos indivíduos dentro do pomar e o número de progênies da mesma árvore-mãe introduzidas na coleção foram planejados com o objetivo de evitar cruzamentos entre aparentados. Do mesmo modo, a amostragem de árvores em condição natural, distantes 500 m entre si, foi assim realizada, para que não se amostrassem indivíduos aparentados. Segundo CHAMBERLAIN et al. (1996), a amostragem que segue esta metodologia induz ao aumento na proporção de heterozigotos na amostra, sendo justificada, portanto, sua recomendação para obtenção de progênies que irão compor pomares de sementes para conservação (ERIKSSON et al., 1993).

Outro fator que pode ter influenciado os resultados encontrados na avaliação da diversidade genética presente na coleção regional e no pomar é o ato de selecionar as 20 sementes que germinaram primeiro dentro de cada família amostrada. Segundo CAMPINHOS et al. (1998), essa metodologia oferece condições de seleção de sementes híbridas mais vigorosas, o que pode contribuir para elevar as estimativas de variabilidade genética. Desta forma, quando se realizou a comparação da variabilidade estimada para as condições de coleção regional e do pomar de sementes, pode ter havido tendência em aproximar as estimativas.

Por outro lado, as espécies que apresentam auto-incompatibilidade estão se prevenindo contra a endogamia por cruzamento entre indivíduos aparentados,

o que induz à manutenção da alta diversidade dentro da espécie. CHAMBERLAIN et al. (1996) reforçaram esta possibilidade quando justificaram a alta heterozigosidade encontrada na espécie *Glericidia sepium* (Jacq.) Walp., como consequência da sua intolerância ao cruzamento entre irmãos completos ou meios-irmãos, o que resultava na eliminação das progênes endogâmicas, por meio do aborto de óvulos.

Dado ao objetivo de conservar a variabilidade genética da população da *P. rigida* estabelecida na região que se estende de Foz do Iguaçu à Guaíra, a amostragem realizada em 1991, para composição do pomar, foi bastante representativa. Tal fato é confirmado não só pelas estimativas dos diferentes parâmetros, mas também pela manutenção nas proporções dos alelos mais raros no pomar.

De modo geral, ainda é uma incógnita o tamanho ideal da amostragem a ser realizada sobre populações de diferentes espécies, tanto para estudar a estrutura genética da espécie de interesse quanto para desenvolver estratégia de conservação da mesma (DIAS e KAGEYAMA, 1991). No entanto, para obter a representatividade genética da população, SHIMIZU et al. (1982) recomendam utilizar de 25 a 50 indivíduos, mantendo-se uma distância mínima de 100 m entre eles. De qualquer forma, mesmo com o aumento do tamanho da população na criação do pomar para conservação e ao incipiente conhecimento sobre as várias espécies tropicais, existe a possibilidade de perda expressiva de parte dos alelos existentes em condição natural.

MORI (1993) estudou o efeito de redução do tamanho efetivo de populações em relação à perda de variação genética. Utilizando cinco locos isoenzimáticos e um total de 21 alelos, o autor analisou três pomares de sementes para melhoramento, formados por 35, 14 e 6 clones, e verificou a ocorrência de erosão dos alelos que possuíam frequências menores que 4,3%, quando se reduziu de 35 para 14 clones no pomar. Na situação mais drástica, que foi a redução de 35 para 6, houve perdas de alelos com frequências inferiores a 17,1%.

MURAWSKI e HAMRICK (1991), comparando a diversidade genética entre dois pomares de sementes melhoradas com as estimativas de 16 populações naturais de *Pinus taeda* L., encontraram que, dos 69 alelos observados nas populações naturais, somente 62,3 e 60,9% do total de alelos foram mantidos nos dois pomares de sementes. Dos alelos erodidos, todos possuíam frequências inferiores a 10%, e a maioria (66%) dos alelos ausentes nos pomares teve frequência abaixo de 1%.

Como lembrado por MORI (1993), mantendo os alelos com alta frequência em uma população comercial, já se pode conseguir aumento de produtividade e homogeneidade. Contudo, a presença de alelos raros na população de melhoramento é importante para viabilidade de estratégias a longo prazo.

Sobretudo, ao obter a variabilidade genética presente na coleção regional, verifica-se que as estimativas foram tendenciosas, por causa do efeito conhecido como princípio Wahlund (HARTL e CLARK, 1997). No entanto, para concluir tal hipótese, seria necessário um levantamento mais minucioso das condições ecológicas de toda a região amostrada, o que envolveria a avaliação da densidade e distribuição dos indivíduos da espécie dentro e próximo aos fragmentos, o tamanho e a distância entre os fragmentos e o levantamento dos agentes polinizadores potenciais para realizar o fluxo gênico para a espécie, testar a auto-incompatibilidade na espécie por cruzamento controlado, além de ser necessário realizar uma amostragem ao acaso, com base nos resultados dos levantamentos anteriores.

4.2.3. Germinação de sementes na avaliação da variabilidade genética

Os valores encontrados para os testes de germinação na coleção regional e no pomar estão aquém dos esperados, de 97 a 100% indicados para a espécie. Mesmo após o armazenamento das sementes, em sacos plásticos, dentro de câmara fria, as sementes do angico-gurucaia apresentam 90% de germinação (CARVALHO, 1994). No entanto, um significativo aumento na média de germinação foi obtido entre as progênies do pomar de sementes.

Com base nos desvios obtidos do total da germinação entre as famílias da coleção regional e as do pomar, observa-se maior homogeneidade no pomar (Figuras 8 e 9). Esta diferença de estimativas concorda com a hipótese de que esteja ocorrendo maior depressão por endogamia nas famílias da coleção regional. Neste sentido, a maior porcentagem de germinação, a distribuição da germinação de forma mais homogênea entre as famílias e também a maior precocidade na germinação indicam que as sementes do pomar possuem qualidade genética superior, provavelmente por causa da livre troca de gametas entre as plantas dessa população. Esse fato reforça a já comentada boa representatividade obtida na amostragem da coleção regional na criação do pomar de sementes.

A taxa de germinação de sementes de uma planta anual (*Clarkia pulchella*) foi utilizada por NEWMAN e PILSON (1997), para avaliar os prejuízos causados pela fragmentação de florestas e pela conseqüente redução do tamanho efetivo da população. Os autores verificaram reduções de 21,1 e 8,7% na taxa de germinação, para as duas populações, e seu estudo permitiu concluir que os prejuízos genéticos impostos pela endogamia e deriva genética sobre populações de reduzido tamanho efetivo não só resultam na diminuição da viabilidade da população, a longo prazo, como também aumentam a probabilidade de extinção da população a curto prazo, sob condições naturais. WILCOX (1983) também verificou que a ocorrência de endogamia por autofecundação em árvores tropicais, geralmente, resulta em efeitos deletérios

que refletem negativamente na produção de sementes viáveis, na germinação de sementes e também durante o período de crescimento de mudas.

Considerando o provável padrão de qualidade genética superior para as sementes do pomar, em relação às sementes coletadas na coleção regional, dois fatores podem ter contribuído para que esta diferença não tenha sido observada nos parâmetros de variabilidade isoenzimática: a condição estabelecida para a germinação das sementes e a metodologia de amostragem das sementes para análise eletroforética.

O processo de germinação das sementes foi desenvolvido sob condições padronizadas, por causa da necessidade de obter tecidos para a extração de enzimas e sua análise eletroforética. No entanto, o efeito de depressão por endogamia, caso esteja estabelecido nas famílias da coleção regional, seria mais contrastante entre as duas populações experimentais amostradas, se as sementes estivessem sob condições ambientais menos favoráveis. Neste sentido, provavelmente, pode ter ocorrido superestimação para a média da germinação na coleção regional. Este fato foi verificado por SNEIZKO e ZOBEL (1988), quando avaliaram os efeitos da depressão por endogamia sobre características fenotípicas (altura e diâmetro) em mudas de *Pinus taeda* L., formadas em casa de vegetação. O efeito de depressão verificado neste trabalho foi menor em relação a outros trabalhos desenvolvidos com a mesma espécie. Segundo os autores, os outros trabalhos, por terem sido desenvolvidos em viveiro, impunham condições ambientais relativamente mais próximas do hábitat natural, para avaliar a capacidade de as progênies se estabelecerem de acordo com seu potencial genético.

Para o segundo fator, a metodologia de amostragem de sementes, ao serem selecionadas as 20 primeiras sementes germinadas para a análise por eletroforética de isoenzimas, pode ter introduzido tendências nas estimativas da variabilidade isoenzimática média para ambas as condições avaliadas. Como já comentado anteriormente, essa metodologia pode ter influenciado as estimativas obtidas para a coleção regional e para o pomar, aproximando seus resultados e,

conseqüentemente, causando redução na eficiência da técnica de eletroforese de isoenzimas, quando um dos objetivos é comparar a variabilidade genética estimada para a condição de pomar e de coleção regional.

Além da forte influência ambiental que favorece a precocidade, a porcentagem de germinação e a maior homogeneidade na germinação das sementes entre as famílias do pomar, em relação às da coleção regional, e os tratamentos silviculturais como a manutenção do pomar, com o objetivo de favorecer a sobrevivência e o desenvolvimento das mudas durante a composição do pomar, podem ter causado vantagens que foram refletidas nas sementes produzidas em 1997. Sob este aspecto, pode ser considerado que a alocação de recursos para as sementes pode ter influenciado os resultados de germinação, a favor do pomar.

Para avaliar a influência dos tratamentos silviculturais que favorecem as famílias do pomar, seria necessário um acompanhamento do desenvolvimento das mudas de ambas as famílias em viveiro e, ou, em condição de campo. Desta forma, o próprio processo de seleção contra indivíduos endogâmicos poderia remover algumas plântulas já no estágio inicial de adaptação ao substrato. Posteriormente, outras características fenotípicas poderiam ser utilizadas na avaliação da variabilidade genética existente na coleção regional e na do pomar, ou mesmo novas análises eletroforéticas que utilizam tecido foliar dos indivíduos.

4.3. Sistema de cruzamento

4.3.1. Ajuste dos dados ao modelo de sistema de cruzamento misto

O MLTR estima os parâmetros de sistema de cruzamento com base no modelo de cruzamento misto, e este considera que não existe ligação entre os locos analisados, ou seja, alelos de diferentes locos segregam independentemente (RITLAND e JAIN, 1981). Desta forma, o desequilíbrio de ligação que envolve os locos Dia-1 e Dia-3 (Quadro 5) pode ter afetado os valores das estimativas.

Confirmando o pressuposto, Hastings (1990), citado por TORGGLER (1995), afirma que o desequilíbrio de ligação gênica em estudos de genética de populações de plantas, por contribuir para a preservação de complexos gênicos co-adaptados, pode causar erros na estimação de determinados parâmetros genéticos. No entanto, a ocorrência de ligações entre locos para espécies alógamas é rara e de menor importância, porque a fecundação cruzada age de forma análoga à recombinação, resultando em ligação menos efetiva ou quebra dela. Todavia, o autor considera que a interação alélica justifica a maioria dos casos de desequilíbrio de ligação em espécies de polinização cruzada e de autofecundação parcial, e salienta que a migração e o tamanho finito de população podem favorecer a ocorrência de associação entre alelos.

O modelo de cruzamento misto também considera que os cruzamentos entre as plantas da população ocorrem ao acaso e sob a mesma taxa. Os testes qui-quadrado para verificar os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Quadro 7) demonstraram que o pomar não está em equilíbrio para três dos quatro locos analisados. O desvio indicado para o loco Dia-3, onde se observou excesso de heterozigotos, segundo BROWN (1979), está relacionado a alguma vantagem para segmento cromossômico que inclui heterozigotos para locos marcadores e à ocorrência de sobredominância associativa. Para o autor, o primeiro modelo implica uma vantagem geral do heterozigoto, tanto para o próprio loco marcador quanto para um bloco de genes com o qual ele está em desequilíbrio de ligação. No segundo modelo, a sobredominância associativa é um caso especial de efeito carona (*hitchhiking*). A hipótese de sobredominância associativa está intimamente relacionada à ocorrência de excesso de heterozigotos para o loco Dia-3, além disto, o autor relaciona este modelo aos casos nos quais existe apenas um loco com avançada heterozigose.

O teste qui-quadrado para verificar a distribuição do conjunto de pólen de forma homogênea sobre o pomar foi altamente significativo para Dia-3 e 6Pgdh-2 (Quadro 8). A distribuição não-homogênea no conjunto de pólen dentro de pomar de sementes, criado para favorecer a recombinação, também foi

encontrada por MORI (1993), em dois pomares de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden.

Segundo Frankie e Haber (1983), citados por MURAWSKI e HAMRICK (1991), a heterogeneidade de frequência alélica no pólen recebido por árvores maternas pode ser causada por fatores como estrutura de famílias, diferença no sincronismo de florescimento de árvores ou algum fator que lidera para variação no comportamento do polinizador para árvores diferentes, tal como o esquema de turno de produção de néctar. Para este último fator, a distribuição do pólen na forma de políade, provavelmente, causa o mesmo efeito, o que será visto mais adiante.

Conforme RITLAND e JAIN (1981) e RITLAND (1990), a grandeza do valor negativo referente ao logaritmo natural das probabilidades de verossimilhança é um dos indicadores do nível de ajuste dos dados à equação de máxima verossimilhança e, portanto, deve ser relacionado ao ajuste dos mesmos quanto às pressuposições do modelo de cruzamento misto. Desta forma, percebe-se que a inclusão do loco Dia-3 na análise reduz a sua acurácia, pela sua maior influência negativa nas estimativas dos parâmetros (Quadro 10). Os autores ainda acrescentam que a falta de ajuste dos dados pode ser causada pela interpretação errônea dos genótipos maternos, pelo número pequeno de plântulas por família e pelo pequeno número de famílias, em virtude da alta proporção de genótipos maternos heterozigóticos e da heterozigosidade alta na população. Estas duas últimas causas se aplicam à influência do loco Dia-3. Este loco apresentou proporção de 50% dos genótipos maternos heterozigóticos para o pomar de sementes, tendo estes sido estimados a partir dos resultados obtidos para as famílias que também apresentaram alta proporção de heterozigotos.

Por outro lado, considerando o tamanho das amostras analisadas, o número de famílias e de indivíduos por famílias satisfaz plenamente as recomendações de BROWN e ALLARD (1970). Estes autores calcularam que 25 famílias de dez indivíduos são suficientes para estimar os genótipos maternos

com cerca de 95% de certeza, devendo-se ressaltar que em populações de fecundação cruzada recomenda-se utilizar 400 indivíduos por população.

Além daqueles fatores que influenciam o ajuste dos dados ao modelo, RITLAND e JAIN (1981) acrescentam que o número de locos analisados influencia as estimativas dos parâmetros de sistema de cruzamento pela análise com múltiplos locos. Com base em estudos de simulação, os mesmos autores concluíram que, para espécies com altas taxas de cruzamentos, quatro ou cinco locos seriam suficientes para garantir estimativas tão acuradas quanto as obtidas da análise de grande número de locos. Neste sentido, as variâncias calculadas pelo método de “bootstrap”, para as estimativas dos parâmetros do sistema de cruzamento, foram próximo de zero, indicando que tais estimativas são bastante precisas (Quadro 9). Além disto, as próprias estimativas não variaram quando se acrescentaram os genótipos do Dia-3, com exceção para o parâmetro que expressa a correlação entre pais, nos casos de fecundação cruzada (r_p).

Estimativas precisas foram também encontradas quando se estimaram os mesmos parâmetros com base numa menor amostragem, ocasião em que se analisaram os frutos coletados em 1998, para os testes de paternidade (Quadro 13). O aumento da negatividade do logaritmo natural das probabilidades de verossimilhança foi justificado pelo pequeno tamanho da amostra (Quadro 14). Nesta amostragem, a predominância de irmãos completos dentro de frutos também pode justificar a condição de desajuste às pressuposições do modelo. Sua grande representatividade dentro das famílias analisadas é verificada pela estimativa obtida para r_p , e será discutida no próximo item, juntamente com a influência do loco Dia-3.

4.3.2. Parâmetros do sistema de cruzamento

O coeficiente de endogamia (F), que quantifica a ocorrência de endogamia com base na redução da heterozigosidade em relação às populações em equilíbrio, indicou que o pomar de sementes está bem próximo do equilíbrio ($F = 0,005 \pm 0,001$). No entanto, os resultados encontrados nos testes qui-quadrado, que testam a ocorrência de cruzamento ao acaso na população com base nos desvios das frequências genóticas, foram significativos para o pomar de sementes (Quadro 7).

Por outro lado, a diferença entre as estimativas dos parâmetros para taxa de fecundação por locos individuais (t_s) foi somente 2,8% menor que a estimativa de multilocos (t_m). Teoricamente, uma diferença significativa só ocorre sob condições de limitado fluxo de pólen ou pela existência de estrutura de família dentro da população, uma vez que as estimativas unilocos são mais sensíveis e tornam-se viesadas para baixo (RITLAND e JAIN, 1981). Assim sendo, a pequena diferença encontrada indica que existe homogeneidade no fluxo gênico do pólen.

Os valores estimados em torno de 0,93 para t_m , em ambas as condições com três ($0,923 \pm 0,039$) ou quatro locos ($0,948 \pm 0,028$), confirmam o sistema de cruzamento predominantemente por fecundação cruzada para a população de *P. rigida*, no pomar de sementes. Esta alta taxa de fecundação cruzada estimada para uma espécie que possui flores hermafroditas, segundo RITLAND (1989), está diretamente relacionada à possível ocorrência de auto-incompatibilidade em *P. rigida*. ARROYO (1981) afirma que auto-incompatibilidade ocorre na maioria das espécies da subfamília Mimosoideae.

Avaliando a possibilidade de ocorrência de autofecundação com base nos 33 frutos analisados para paternidade múltipla, apenas os frutos A2/2, A6/1, A7/3 e A9/2 não confirmaram a ocorrência de fecundação cruzada (Quadro 16) e, neste caso, não se pode descartar a ocorrência de autofecundação. Todos os outros

frutos apresentaram confirmação não-ambígua de fecundação por políade de outra planta diferente.

Altas taxas de cruzamento têm sido obtidas para algumas espécies florestais tropicais de características semelhantes ou para aquelas que apresentam baixa densidade de indivíduos em suas populações (espécies raras). STACY et al. (1996) estimaram o sistema de cruzamento de três espécies tropicais com o programa MLT e encontraram 100% de fecundação cruzada para populações de *Calophyllum longifolium* Willd. (Clusiaceae), *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) e *Turpinia occidentalis* G. Don subsp. *breviflora* Croat (Staphyleaceae), todas com flores hermafroditas, polinizadas por insetos, e que ocorrem em baixa densidade nos sítios estudados (1 árvore adulta/ 2,2 a 6 ha). Para a espécie *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae, que ocorre nas regiões úmidas das florestas tropicais e também apresenta sistema de auto-incompatibilidade, O'MALLEY et al. (1988) obtiveram estimativas de 0,85 para t_m e 0,80 para t_s . Ao mesmo tempo, MUONA et al. (1991), estudando duas populações naturais de *Acacia melanoxylon* R. Br. (Leguminosaceae - Mimosoideae), espécie secundária inicial e que também possui políade, estimaram taxas de fecundação cruzada de 0,86 e 1,00.

Segundo revisão apresentada por LEPSCH-CUNHA (1996), das estimativas de taxa de cruzamento para sete espécies tropicais de baixa densidade, emergentes, colonizadoras de clareira ou secundárias, polinizadas por animais e com dispersão de sementes pelo vento, apenas duas espécies apresentaram resultados que indicam sistema misto de reprodução, enquanto as cinco espécies restantes apresentaram t_m em torno de 0,94. A autora relacionou o sistema de cruzamento típico de espécies predominantemente alógamas também para quatro espécies, caracterizadas por apresentarem distribuição comum, ocuparem dossel ou subdossel das florestas e serem comuns em estágio sucessional inicial, tendo a média obtida das espécies sido 0,96.

Por outro lado, a grande maioria dos trabalhos publicados é resultante de amostragem sobre populações naturais. Espera-se que a taxa de fecundação para

angico-gurucaia no pomar de sementes seja um pouco superior à obtida de populações sob condição natural. Fortalecendo esta hipótese, MUONA et al. (1989) verificaram redução no nível de endogamia em um pomar de sementes de *Eucalyptus regnans* F. Muell., quando comparado com coleção regional. Analisando genótipos de dez locos isoenzimáticos, os autores encontraram $t = 0,91$ para o pomar e $t = 0,74$, para uma coleção regional próxima ao pomar. Essas diferenças foram justificadas pela redução no cruzamento entre plantas aparentadas no pomar, o que está associado também a diferenças na idade, no tamanho e na densidade de árvores nas diferentes populações. A mesma condição foi verificada por BARRETT et al. (1987). Os autores, estudando o sistema de cruzamento num pomar de sementes de *Picea mariana*, encontraram um valor de fecundação cruzada ($t_m = 0,84$) maior do que normalmente é encontrado para populações naturais da espécie ($t_m = 0,79$), o que evidencia um resultado positivo quanto à recombinação gênica entre as diferentes plantas, de diferentes locais, que passaram a compor o pomar de sementes. No entanto, em ambas as citações, já foi confirmada a ocorrência de autofecundação nas espécies em questão. Portanto, um trabalho mais específico de cruzamento controlado para *P. rigida* seria importante para facilitar a discussão sobre o assunto.

4.3.3. Cruzamentos correlacionados

As estimativas sobre os parâmetros de correlação são obtidas ao utilizar um modelo que se baseia em repetidas amostragem de pares de sementes dentro de famílias na população (*sibling-pair model*, segundo RITLAND, 1989). Durante as amostragens, o sistema de cruzamento existente na população afeta diretamente o parentesco entre as duas sementes da mesma amostra, devendo-se ressaltar que, se existe tendência para que estas sementes sejam resultantes de fecundação cruzada ou autofecundação, existirá, portanto, uma correlação no cruzamento. Sob essa circunstância, o parentesco médio observado entre as

famílias é aumentado, e os pais dessas amostras são idênticos por uma probabilidade maior que o acaso.

Nesse sentido, a relação genética entre duas sementes de dada família depende da possibilidade de ocorrência de endogamia biparental ou por autofecundação, da existência de correlação no cruzamento (r_t) e da correlação entre grãos de pólen nos casos de fecundação cruzada (r_p) (RITLAND, 1989). A correlação no cruzamento expressa a chance pela qual duas sementes, amostradas de uma coleção, sejam mais ou menos prováveis de ser originadas do mesmo tipo de cruzamento, em relação ao acaso. Já a correlação de paternidade (r_p) é estimada de sementes resultantes de fecundação cruzada e representa a proporção de pares de sementes-irmãs completas, amostrados entre famílias de fecundação cruzada.

Os resultados dos parâmetros para correlação no cruzamento e para paternidade foram significativos para o pomar ($r_t = 0,194$ e $r_p = 0,201$). Resultados significativos para ocorrência de correlação estão normalmente relacionados a espécies que possuem dependência de agente polinizador específico e de curta capacidade de forrageamento, ou a espécies que apresentam seus grãos dispersos em estrutura como políades ou políneas.

A espécie *Milulus guttatus* D.C. (Scrophulariaceae), por exemplo, possui cruzamento misto (50% de autofecundação) e frutos como cápsulas, e apresentou 0,00 e 0,05 de cruzamentos correlacionados (r_t) e 0,22 e 0,21 de correlação de paternidade (r_p) para duas populações (RITLAND, 1989). Estes dados foram obtidos com reamostragem de sementes entre cápsulas dentro de populações, mas quando foram amostradas sementes dentro de cápsulas, as mesmas estimativas foram 0,17 e 0,12 para r_t e 0,37 e 0,44 para r_p . Esta espécie não possui políade, no entanto, suas flores são polinizadas por abelhas, que abrangem pequena área de forrageamento, o que justifica aquelas estimativas por favorecer cruzamentos entre indivíduos aparentados.

A espécie *P. rigida* possui agentes polinizadores eficientes como, por exemplo, abelhas de médio porte *Melipona* e *Trigona* (KAGEYAMA, 1992). No

entanto, observações em microscópio óptico confirmaram a existência de políades com 12 e 16 grãos de pólen, para esta espécie, completando a citação de CRUDEN (1977) para a ocorrência de políades para a maioria das espécies da subfamília Mimosoideae. A influência das políades no sistema de reprodução é mais bem estudada para as espécies de *Acacia* (Leguminosae - Mimosoideae). Os dados indicam que as políades conferem uma vantagem seletiva na reprodução, por proporcionar um meio eficiente na dispersão de grãos de pólen por insetos, e asseguram que, com um único evento bem-sucedido de polinização, sejam produzidas várias sementes (KENRICH e KNOX, 1982). Esses autores verificaram ser comum uma correlação entre o número de grãos de pólen em políades e o número máximo de sementes em frutos e, sob mais complexa relação, entre o número do óvulos. Desta forma, uma única unidade tem potencial para fertilizar todos os óvulos dentro do mesmo ovário. Nestas condições, a presença de políades parece ter específica adaptação para garantir a produção de sementes após uma única polinização.

Todas essas informações foram verificadas para a espécie *P. rigida*, com base nas avaliações realizadas com os frutos coletados em 1998 e também de algumas inflorescências. Portanto, as estimativas obtidas para os parâmetros de correlação são justificadas pela transferência, não ao acaso, dos grãos de pólen sob a forma de políades.

A influência das políades tornou-se mais marcante no processo de reprodução, quando os resultados das frequências genotípicas das sementes que foram mantidas individualizadas por cada um destes 33 frutos foram analisados para os parâmetros de cruzamento correlacionados (Quadro 13). Sua influência pode ser verificada também pelas diferenças nas frequências alélicas para os óvulos e grãos de pólen estimados nesta amostragem mais restrita (Quadro 15).

Associado ao aumento das estimativas de correlação está a proporção dos frutos compostos por sementes resultantes de uma única políade ou de mais de uma. No estudo de paternidade múltipla, foi constatado que a maioria dos frutos da espécie possui todas sementes-irmãs completas. Também na análise de

variância, o componente de variação para indivíduos dentro de famílias foi nulo, o que concorda com os resultados desse teste.

Associando os resultados do teste de paternidade múltipla às estimativas para correlação de grãos de pólen (r_p), obtidos com e sem o loco Dia-3 (0,515 e 0,289, respectivamente), calculado para a mesma amostra, verifica-se que a estimativa deveria ser bem elevada. A análise de correlação foi realizada com reamostragem de pares de sementes dentro de famílias da população, tendo as famílias sido compostas por sementes obtidas de apenas quatro frutos. Desta forma, a estimativa indicada com a exclusão do Dia-3 está mais próxima do esperado.

MUONA et al. (1991) encontraram, em *Acacia melanoxylon* R. Br., proporção de frutos com paternidade múltipla foi de 8 e 15%. Utilizando o método de pares de progênies, os autores verificaram que existia expressiva correlação entre cruzamentos, ocorrendo em diferentes níveis de hierarquia dentro da mesma planta e população, devendo-se ressaltar que a correlação diminuía no sentido de sementes amostradas de frutos dentro de inflorescência (0,46), frutos dispostos no mesmo grupo na copa (0,35), para frutos dentro de árvores (0,25), sendo o último nível hierárquico correspondente ao analisado para o angico-gurucaia.

A existência de correlação no sistema de cruzamento da espécie, influenciando a distribuição gênica entre as progênies, tem importância para as estratégias de melhoramento. Os melhoristas, visando determinadas características particulares da espécie, procuram prever os ganhos genéticos obtidos a partir de processos de seleção e cruzamentos. Para isto, os dados são avaliados principalmente com base na variância aditiva da característica quantitativa com que se trabalha (FALCONER, 1987). Como normalmente se considera que uma família obtida por polinização aberta é constituída por meios-irmãos, numa condição de cruzamentos correlacionados a variância aditiva pode ser subestimada.

O angico-gurucaia possui inflorescências na forma de espiga. Segundo ARROYO (1981), a compactação de várias flores hermafroditas em inflorescência seria uma estratégia para aumentar a atração dos polinizadores mais distantes, o que se tornaria ainda mais eficiente em virtude da cor creme ou amarelo-esverdeada das flores dessa espécie. Associando as políades e a potencial auto-incompatibilidade às inflorescências, tem-se uma eficiente estratégia para garantir a produção de satisfatório número de sementes a partir de uma única polinização bem-sucedida e, ao mesmo tempo, seleciona-se contra a produção de progênies endogâmicas. Desta forma, as flores que recebem políade de autofecundação ou de indivíduos aparentados seriam abortadas, e este mecanismo não prejudicaria a formação de um fruto na flor adjacente.

Tal estratégia para garantir a produção de sementes foi constatada por JANZEN et al. (1980), estando associada à limitação de agentes de polinização. Estes autores estudaram as variações na frutificação de *Eucyclia cordigerai* (Orchidaceae), que possui inflorescências com 1 a 13 flores, em função da distribuição de grãos de pólen em políneas e ao tipo de cruzamento. Os autores não encontraram diferenças na proporção de inflorescências que produziram frutos entre as plantas autofecundadas com aquelas polinizadas por pólen de um único pai. No entanto, das inflorescências que foram polinizadas por grãos de pólen de vários pais, cerca de 97% de suas flores produziram frutos, sendo significativamente superior ao número de flores fecundadas em inflorescências que foram autofecundadas. Além disto, eles verificaram que a proporção de frutos produzidos pelas plantas que foram manualmente polinizadas foi maior que aquelas não-manipuladas, o que indica que a produção de frutos pela espécie pode ter limitação pela disponibilidade de polinizadores.

A existência de um eficiente processo seletivo contra progênies endogâmicas é fundamental para a sobrevivência de espécies pioneiras e agressivas durante o processo de colonização. Essas espécies, como o angico-gurucaia, se difundem tipicamente, colonizando clareiras formadas em contínuos florestais ou se alastrando com facilidade por formações secundárias, onde

ocorrem com maior densidade (EMBRAPA, 1986). A constante migração da espécie para novos domínios seria condição muito propícia para sofrer perda de viabilidade genética pelo efeito gargalo (*bottleneck*), acompanhado de deriva genética pelo efeito fundador. Os constantes prejuízos sobre a variabilidade genética das novas populações formadas seriam, portanto, reflexo da redução do seu tamanho efetivo sobre o simultâneo aumento de genótipos homozigotos. Assim, os novos domínios compostos por indivíduos resultantes de uma amostragem da população original seriam suscetíveis ao declínio causado por variações ambientais ou influências de patógenos.

Portanto, todas as condições estudadas indicam que a espécie possui um mecanismo de auto-incompatibilidade associado à formação de sementes exogâmicas, como estratégia para colonização. No entanto, para se tornar conclusivo, novamente seria necessário realizar um estudo de cruzamento controlado, para esclarecer a eficiência do organismo materno em selecionar gametas recebidos na forma de políades.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este estudo foi desenvolvido para avaliar a eficácia da implantação de um pomar de sementes, formado com os objetivos de conservação *ex situ* e produção de sementes de qualidade genética superior de espécies florestais arbóreas. Esse pomar foi formado por mudas de uma coleta de sementes realizada de forma estratificada de árvores localizadas em fragmentos florestais, dispostos ao longo de 2.915 km, correspondente à extensão da margem brasileira do lago formado pelo represamento do rio Paraná, a partir da construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu. O estudo baseou-se em uma população experimental de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan, composta por 30 famílias de 20 indivíduos cada, obtida de árvores distantes entre si (mínimo de 500 m) em fragmentos florestais ao longo da região natural já caracterizada (coleção regional) e de uma outra amostra do mesmo tamanho, obtida do pomar de sementes.

Aplicando a técnica de eletroforese de isoenzimas com base em quatro locos polimórficos (Sod-2, Dia-1, Dia-3 e 6Pgdh-2) e somando 11 alelos, estudou-se o sistema de cruzamento da espécie no pomar de sementes e estimou-se a variabilidade genética existente nas duas populações experimentais.

A taxa de fecundação cruzada no pomar de sementes foi elevada ($t_m = 94,8\%$), em detrimento da ocorrência de endogamia pelo cruzamento entre indivíduos aparentados ($F = 0,005$). Os resultados permitiram confirmar a existência de cruzamentos correlacionados no pomar de sementes ($r_t = 0,194$ e $r_p = 0,201$). Estudos complementares indicaram que a disseminação de grãos de pólen em políades justifica essa ocorrência. Os testes de paternidade múltipla complementaram tais resultados, demonstrando que a maior parte dos frutos formados na espécie (64%) possui sementes-irmãs completas.

A variabilidade genética estimada para as duas condições amostradas concorda com algumas espécies tropicais que apresentaram alta variabilidade em suas populações naturais. Os níveis de variação genética estimados foram similares, com 2,07 e 1,93 alelos por loco polimórfico, 73,34 e 65% de locos polimórficos e valor de heterozigosidade observada (H_o) de 0,26, para ambas, e heterozigosidade esperada (H_e) de 0,23 e 0,21, para o pomar de sementes e coleção regional, respectivamente. Além destes, o índice de diversidade de Shannon-Weaver, calculado a partir das frequências fenotípicas de sete locos polimórficos (Sod-2, Dia-1, Dia-3, 6Pgdh-2, Est-1, Est-3 e Adh), não indicou diferenças entre as médias obtidas para as duas condições, 0,4242 e 0,4265 para o pomar e coleção regional, respectivamente.

Os resultados dos testes de germinação de sementes indicaram maior precocidade, maior viabilidade e maior homogeneidade na germinação de sementes das famílias do pomar, em relação às da coleção regional. Estes resultados permitem inferir que o pomar de sementes foi efetivo não apenas para a conservação *ex situ* da variabilidade genética resgatada pela amostragem estratificada sobre a região natural abrangida neste estudo, mas também que ele esteja favorecendo a recombinação gênica e, conseqüentemente, revertendo a ação de depressão por endogamia, que provavelmente está atuando sobre características adaptativas da espécie nas famílias que compõem a coleção regional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., BRUNE, W. Eletroforese em gel de amido. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p.115-150.
- ALFENAS, A.C, BRUNE, W., OLIVEIRA, J.R., ALONSO, S.K., SCORTICHINI, M. Eletroforese de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p.85-114.
- ALFENAS, A.C., PETERS-ROBINSON, I., BRUNE, W., PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: SIF, 1991. 242p.
- ARROYO, M.T.K. Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In: POLHILL, R.M., RAVEN, P.H. (Eds.). **Advances in legume systematics**. Kew, England: Royal Botanic Gardens, 1981. Pte.2, p.723-769.
- BARRETT, J.W., KNOUWLES, P., CHELIAK, W.M. The mating system in a black spruce clonal seed orchard. **Canadian Journal of Forest Research**, v.17, n.5, p.379-382, 1987.
- BROWN, A.H.D. Enzyme polimorfismo in plant populations. **Theoretical Population Biology**, v.15, n.1, p.1-42, 1979.
- BROWN, A. H. D., ALLARD, R. W. Estimation of tee mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. **Genetics**, v.66, n.1, p.133-145, 1970.
- BROWN, A.H.D., WEIR, B. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY S.D., ORTON T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. Pt.A, p. 220-239.
- CAMPINHOS, E.C., PETERS-ROBINSON, I., BERTOLUCCI, F.L., ALFENAS, A.C. Interspecific hybridization and inbreeding effect in seed from a *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clonal orchard in Brazil. **Genetics in Molecular Biology**, v.21, n.3, p.369-374, 1998.

- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo, PR: EMBRAPA-CNPQ/SPI. 1994. 640p.
- CHAMBERLAIN, J.R. Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae): its implications for species delimitation and conservation. **American Journal of Botany**, v.85, n.1, p.37-47, 1998.
- CHAMBERLAIN, J.R., GALWEY, N.W., SIMONS, A.J. Population structure in *Gliricidia sepium* (Leguminosae) as revealed by isozyme variation. **Silvae Genetica**, v.45, n.2, p.112-118, 1996.
- CHELIAK, W.M., PITEL, J.A. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. **Canadian Journal of Forest Research**, v.14, n.5, p. 740-743, 1984.
- CRUDEN, R.W. Pollen-ovule ratio: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, v.31, n.1, p.32-46, 1977.
- DIAS, L.A.S., KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**, v.3, n.3, p.119-127, 1991.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná.** Brasília, DF: 1986. 89p. (EMBRAPA-CNPQ, Documento, 17).
- ERIKSSON, G., NAMKOONG, G., ROBERDS, H. Dynamic gene conservation for uncertain futures. **Forest Ecology and Management**, v.62, p.15-37, 1993.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa.** Viçosa, MG: UFV, 1987. 279p.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SHONEWALD-COX, C.M., THOMAS, W.L. (Eds.). **Genetics and conservation.** Menlo Park, C.A., The Benjamin/Cummings, 1983. p. 335-348.
- HAMRICK, J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. (Ed.). **Isozymes in Plant Biology.** Portland: Dioscorides Press, 1989. p. 87-105.
- HAMRICK, J.L., LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v.18, n.3, p.201-207, 1986.

- HARTL, D.L., CLARK, A.G. **Principles of population genetics**, 3.ed. Massachusets: SINAUER, 1997. 542p.
- HEYWOOD, V.H., STUART, S.N. Species extinctions in tropical forests. In: WHITMORE, T.C., SAYER, J.A. (Eds.). **Tropical deforestation and species extinction**. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 91-114.
- JAIN, S.K., QUALSET, C.O., BHATT, G.M., WU, K.K. Geographical patterns of phenotypic diversity in a world collection of durum wheats. **Crop Science**, v.15, n.5, p.700-704, 1975.
- JANZEN, D.H., DELVIES, P., GLADSTONE, D.E., HIGGINS, M.L., LEWINSOHN, T.M. Self - and cross – pollination of *Encyclia condigera* (Orchidaceae) in Santa Rosa National Park, Costa Rica. **Biotropica**, v.12, n.1, p.72-74, 1980.
- KAGEYAMA, P.Y., DIAS, I.S. Aplicação da genética em espécies florestais nativas. Anais do congresso Nacional Sobre Essências Nativas. In: **Silvicultura em São Paulo (Brasil)**, v.16, p.782-791, 1982.
- KAGEYAMA, P.Y. Recomposição da vegetação com espécies arbóreas nativas em reservatórios de usinas hidrelétricas da CESP. **Série técnica IPEF**, v.8., n.25, p.1-43, 1992.
- KENRICH, J., KNOX, R. B. Function of the polyad in reproduction of *Acacia*. **Annals of Botany**, v.50, n.5, p.721-727, 1982.
- LEPSCH-CUNHA, N. **Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia central**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1996. 147p. Dissertação (Mestrado Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1996.
- MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Curitiba, PR: Papelaria Max Roesner, 1968. 350p.
- MARTINS, S.S. **Efeitos da exploração madeireira no solo, na florística e na estrutura de uma floresta estacional semidecidual no sudoeste do Paraná**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciência Floreal) - Universidade Federal de Viçosa.
- MORAES, M.L.T. **Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F.& M.F. alemão Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Enger)**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1992. 139p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1992.

- MORAN, G.F., MUONA, O., BELL, J.C. *Acacia mangium*: a tropical forest tree of the coastal lowlands with low genetic diversity. **Evolution**, v.43, n.1, p.231-235, 1989.
- MORI, E.S. **Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1993. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”, 1993.
- MUONA, G.G., BELL, J.C., GRIFFIN, A.R. Reduction in levels of inbreeding in a seed orchard of *Eucalyptus regnans* F. Muell. compared with natural populations. **Silvae Genetica**, v.38, n.1, p.32-36, 1989.
- MUONA, O., MORAN, G.F., BELL, J.C. Hierarchical patterns of correlated mating in *Acacia Melanoxylon*. **Genetics**, v.127, n.3, p.619-626, 1991.
- MURAWSKI, D.A., HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v.67, n.2, p.167-174, 1991.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, n.3, p.583-590, 1978.
- NETTO, S.P. **Inventário florestal nacional, florestas nativas: Paraná/Santa Catarina**. Brasília, DF: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 390p.
- NEWMAN, D., PILSON, D. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. **Evolution**, v.51, n.2, p.354-362, 1997.
- O’MALLEY, D.M., BAWA, K.S. Mating system of a tropical rain forest tree species. **American Journal of botany**, v.74, n.8, p.1143-1149, 1987.
- O’MALLEY, D.M., BUCKLEY, D.P., PRANCE, G.T., BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.; Lecythidaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, n.6, p.929-932, 1988.
- PAIVA, J.R. **Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd) ex A.D.C. Muell. Arg.)**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1992. 144p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1992.

- PARKER, P.G., SNOW, A.A., SCHUG, M.D., BOOTON, G.C., FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations. Choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.
- PETERS-ROBINSON, I., ZELAZOWSKI, V.H. Seed plantations for genetic conservation during tropical forest restoration. **Abstracts of the Society for Ecological Restoration Conference**, Madison, 1991.
- PHILLIPS, M.A., BROWN, A.H.D. Mating system and hybridity in *Eucalyptus pauciflora*. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.30, n.4, p.337-344, 1977.
- RAJORA, O.P. Marker allozyme genes and alleles for differentiation of *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximoviczii*, and their interespecific hybrids. **Canadian Journal of Botany**, v.68, n.5, p.990-998, 1989.
- RIBAS, L.A. Técnica de extração e eletroforese de isoenzimas de quatro espécies florestais nativas. In: GONÇALVES, W., **Trabalhos monográficos dos estudantes do curso de engenharia florestal**. Viçosa, MG: UFV, 1997. V.2, p.168-230.
- RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **The Journal of Heredity**, v.81, n.3, p.235-237, 1990.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer. **Evolution**, v.43, n.4, p.848-859, 1989.
- RITLAND, K. Estimation of mating systems. In. TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. Pt.A, p 289-303.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program**; version 1.1, 1994 [22.02.99]. (<http://for.gen.forestry.ube.ca/ritland/kermit.html>).
- 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 Applied Genetics**, v.71, n.3, p.375-384, 1985.
- RITLAND, K., JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, v.47, n.1, p.35-52, 1981.
- RODRIGUES, J. P. F. **Análise de isoenzimas em progênies de meio-irmãos de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.

- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v.3, p.37-79, 1969.
- SHANNON, C.E., WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: The University of Illinois Press, 1964. 125p.
- SHAW, D.V., ALLARD, R.W. Estimation of outcrossing rates in douglas-fir using isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, n.2, p.113-120, 1982.
- SHIMIZU, J.Y., KAGEYAMA, P.Y., HIGA, A.R. **Procedimentos e recomendações para estudos de progênies de essências florestais**. Curitiba: EMBRAPA/URFCS, 1982. 33p. (Documento 11).
- SILVEIRA, L.R.M., OLIVEIRA, J.C.P., MORAES, C.O.C., MARQUES, D.G. Análise da diversidade genética em acessos de *Bromus auleticus* Trinius. **Ciência Rural**, v.27, n.3, p.381-385, 1997.
- SNEIZKO, R.A., ZOBEL, B.J. Seedling Height and diameter variation of various degrees of inbred and outcross progênies of loblolly pine. **Silvae Genetica**, v.37, n.2, p.50-60, 1988.
- STACY, E.A., HAMRICK, J.L., NASON, J.D., HUBBELL, S.P., FOSTER, R.B., CONDIT, R. Pollen dispersal in low-density populations of three neotropical tree species. **Annual Nature**, v.148, n.2, p.275-298, 1996.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics. A biometrical approach**. 2.ed. New York: McGRAW-HILL Book, 1980. 633p.
- SWOFFORD, D.L., SELANDER, R.B. **Biosys-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics**. Champaign, D.L: Swofford, 1989. p.11-22.
- TORGGLER, M.G.F. **Isoenzimas - variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186p.
- TURNER, I.M., CORLETT, R.T. The conservaton value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. **Trees**, v.11, n.8, p.330-333, 1996.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis; methods for discrete population genetic data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1990. 377p.
- WILCOX, M.D. Inbreeding depression and genetic variances estimated from self and cross-pollinated families of *Pinus radiata*. **Silvae Genetica**, v.32, n.3-4, p.89-96, 1983.

ZUIDEMA, P.A., SAYER, J.A., DIJKMAN, W. Forest fragmentation and biodiversity: the case for intermediate-sized conservation areas. **Experimental Conservation**, v.23, n.4, p.290-297, 1996.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Quadro 1A - Frequências genotípicas observadas nas 30 famílias do pomar, para o loco 2 da 6-fosfogluconato desidrogenase (Pgdh-2) em *Parapiptadenia rigida*

Família	Genótipos									
	0	aa	ab	bb	ac	cc	bc	cd	ad	bd
1		4	1		7		8			
2					2	14	1	3		
3					1	18		1		
4					5	15				
5			1	1	2	10	5			1
6						20				
7						20				
8						18	1	1		
9					7	12		1		
10	1				3	16				
11					1	12	4	3		
12		3			5	12				
13						18	1	1		
14						9	1	10		
15					1	15	3	1		
16					4	16				
17	1				3	9	7			
18					13	7				
19						20				
20						19		1		
21						19	1			
22					1	19				
23						9	10			1
24					1	19				
25				1		9	8	1	1	1
26						18		2		
27					2	17	1			
28						20				
29						16	3	1		
30					4	14	2			
TT	2	7	2	1	62	440	56	26		3

Quadro 2A - Frequências genóticas apresentadas pela coleção regional, para o loco 2 da 6-fosfogluconato desidrogenase (Pgdh-2) em *Parapiptadenia rigida*

Família	Genótipos									
	0	aa	ab	bb	ac	cc	bc	cd	ad	bd
1					2	18				
2					12			7	1	
3							20			
4					1	18		1		
5					1	18		1		
6						10		9		
7			2		1	10	7			
8			4		8	8				
9			1	1		7	11			
10			1	4	8		7			
11						12	8			
12					3	16	1			
13						20				
14						20				
15					1	12	6	1		
16						20				
17				3	3	7	7			
18					3	15		2		
19					13		5		1	1
20						16	4			
21						16	4			
22					1	11	8			
23						19	1			
24					2	18				
25						19	1			
26					3	17				
27						20				
28						17	3			
29			1		5	12	1	2		
30		3			14	3				
TT		3	9	8	81	398	75	23	2	1

Quadro 3A - Frequências genótípicas observadas nas 30 famílias da coleção regional e do pomar de sementes, para o loco 1 da diaforase (Dia-1) em *Parapiptadenia rigida*

Pomar de Sementes					Coleção Regional				
Família	Genótipos				Família	Genótipos			
	0	aa	ab	bb		0	aa	ab	bb
1		16	4		1		16	4	
2		10	6	4	2		19	1	
3		14	6		3		15	5	
4		8	12		4		15	5	
5		20			5		16	4	
6		17	3		6		18	2	
7		18	2		7		9	9	2
8		18	2		8		15	5	
9		20			9		19	1	
10		18	2		10	1	4	12	3
11		18	2		11		15	5	
12		18	2		12		16	4	
13		7	10	3	13		18	2	
14		18	2		14		20		
15		20			15		20		
16		17	3		16		20		
17		9	9	2	17		13	7	
18		15	5		18		17	3	
19		18	2		19		16	4	
20		17	3		20		19	1	
21		20			21		19	1	
22		20			22		18	2	
23		19	1		23		19	1	
24		9	7	4	24	1	18	1	
25		18	2		25		20		
26		20			26		20		
27		20			27		16	4	
28		20			28		13	7	
29		20			29		15	5	
30		20			30		14	6	
TT		502	85	13	TT	2	492	101	5

Quadro 4A - Frequências genóticas observadas nas 30 famílias da coleção regional e do pomar de sementes, para o loco 3 da diaforase (Dia-3) em *Parapiptadenia rigida*

Pomar de Sementes					Coleção Regional				
Família	Genótipos				Família	Genótipos			
	0	aa	ab	bb		0	aa	ab	bb
1	1	11	8		1	20			
2	1	14	5		2	5	14	2	
3		14	5	1	3	8	12		
4	1	9	10		4	7	13		
5	4	10	6		5	1	9	10	
6		8	10	2	6	6	14		
7		12	8		7	2	2	16	
8		11	7	2	8	4	7	6	3
9		10	10		9	1	11	8	
10	1	1	8	10	10	20			
11	1	9	10		11	20			
12	1	4	12	3	12	14	6		
13		4	10	6	13	11	4		5
14	1	5	14		14	11	9		
15		3	16	1	15	20			
16	2	11	7		16	18	2		
17		5	15		17	11	9		
18		4	11	5	18	1	6	13	
19	1	11	7	1	19	3	13		4
20	1	14	5		20	5	14		1
21	1	4	13	2	21	9	11		
22		16	4		22	2	8	9	1
23		8	12		23	6	14		
24	1	12	5	2	24	12	8		
25		6	14		25	1	4	5	10
26	1	2	13	4	26	20			
27		12	8		27	1	15	4	
28		13	7		28	1	13	6	
29		9	11		29	8	12		
30		9	8	3	30	5	15		
TT	18	261	279	42	TT	94	234	247	25

Quadro 5A - Frequências genotípicas observadas para as 30 famílias da coleção regional e do pomar de sementes, para o loco 2 da superóxido dismutase (Sod-2)

Pomar de Sementes							Coleção Regional						
Família	Genótipos						Família	Genótipos					
	0	aa	ab	bb	ac	bc		0	aa	ab	bb	ac	bc
1				16		4	1		4	15		1	
2				17		3	2			12		8	
3		3	10	5	2		3			20			
4			2	18			4			20			
5				18		2	5			20			
6				20			6			17		3	
7				18		2	7			18		2	
8				20			8			20			
9			3	15		2	9			19		1	
10	1			19			10			18		2	
11		1	12	3	2	2	11			20			
12				20			12			20			
13			1	11		8	13			18		2	
14				20			14			20			
15				19		1	15			20			
16			1	18		1	16			20			
17				20			17			20			
18				20			18			20			
19				19		1	19			20			
20				20			20			20			
21				19		1	21			20			
22				18		2	22			19		1	
23				12		8	23			19		1	
24			1	18		1	24			20			
25			1	19			25			20			
26			2	16		2	26			19		1	
27				14		6	27			20			
28				20			28			20			
29			8	8	2	2	29			20			
30			4	14		2	30			20			
TT	1	4	45	494	6	50	TT		4	574		22	

Quadro 6A - Frequências fenotípicas encontradas para o loco 1 da esterase (Est-1), em famílias da coleção regional e do pomar de sementes em *Parapiptadenia rigida*

Pomar de Sementes					Coleção Regional				
Família	Fenótipos				Família	Fenótipos			
	0	1	2	3		0	1	2	3
1		18	2		1	3	11	5	1
2		18	2		2		20		
3		9	11		3		10		10
4		16	3	1	4	20			
5		10	10		5		20		
6		16	4		6	3	7	10	
7		9	8	3	7		14	6	
8		12	8		8	20			
9		13	7		9		7	12	1
10	1	16	3		10	1	12	7	
11		19	1		11	20			
12		13	6	1	12	1	11	9	
13		15	5		13		12	6	2
14		17	3		14	20			
15		18	2		15	20			
16		20			16		12	6	2
17		18	2		17		9	10	1
18		8	12		18		16	3	1
19		19	1		19	20			
20		13	7		20		20		
21		18	2		21		9	11	
22		12	8		22		12	7	
23		17	2	1	23		14	5	1
24		19	1		24		5	15	
25		20			25		16	4	
26		18	2		26		12	4	4
27		17	3		27		14	6	
28		20			28	20			
29		19	1		29	20			
30		20			30		5	8	7
TT	1	477	116	6	TT	168	268	134	30

Quadro 7A - Frequências fenotípicas encontradas nas 30 famílias da coleção regional, para o loco 3 da esterase (Est-3) em *Parapiptadenia rigida*

Família	Fenótipos												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1					4						1	8	7
2			3	6		1	5	1	4				
3	1	2			2	5				2		6	2
4	1	1	1	1		9	3				2		
5		4	1			10	4	1					
6			3			17							
7			6		2	7			2			2	1
8				2		5	2		4		1		6
9				10			4		3		3		
10			1		3	5	4		1			1	5
11						14			1			3	2
12				6	3	5	2	1	1				2
13		2		4		3	7	2				2	
14			2	10			1	1	6				
15		3	10			6			1				
16				3			10	3	4				
17			3			4	8		5				
18			9			11							
19	1			11			5		3				
20				3	1	1	2	1	6	1	4		1
21		3		2		7	2	1	4		1		
22				12				2	4		1		1
23	1	1	12			4		1				1	
24	3	1	1		4	2					3	2	4
25	6		2	1		11							
26				1		13	6						
27			6	1		4		1	3	2		3	
28			3	5		1	1	6			1		
29		3	3	1		5	1		1	2	1	4	2
30			8			12							
TT	14	20	74	79	19	162	67	21	53	7	18	30	35

Quadro 8A - Frequências fenotípicas encontradas nas 30 famílias do pomar, para o loco 3 da esterase (Est-3) em *Parapiptadenia rigida*

Família	Fenótipos												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1			3	3		5	5	2	2				
2				4			9		5			2	
3		1	2	1		4	1		1	3		4	2
4		2		4		5	3	3		2	1		
5			3	2		3			2		1	10	
6		2	4			13			1				
7		9	1	1		6		2		1			
8		7				8		5					
9			9			3			5			3	
10	1	11				1	2	4					1
11				5	1	1	6	1	1	2			3
12		2				13	3	2					
13	1		6	3		4	3	2				1	
14		2				9		3	2	1			
15		1	4			15					3		
16	1	2	4		1	5	1	4	1			1	
17		6	3			5		4	2				
18				1		12	3	4					
19		7	2	2		8		1					
20		6				8	1			5			
21				6	3		1		2		4	1	3
22		2	7			8		1		2			
23				1		10	6		1		2		
24		2	2	1		9	4						2
25		1	2	1		4	1			2		4	5
26			8		1	3				1	2	3	2
27	1	1	5	4		2	2	5					
28			1		3	9	2					2	3
29		4	1	1		2		1		8	1		2
30						6	3		4	1		5	1
TT	4	68	67	40	9	181	56	44	29	28	14	36	24

APÊNDICE B

Quadro 1B - Resultados do acompanhamento da germinação de sementes das 30 famílias do pomar de sementes de *Parapiptadenia rigida*, até o sexto dia do teste. Valores em porcentagem

Famílias	Dias Consecutivos					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
1	22	62	4	3	2	0
2	0	19	48	22	1	5
3	2	42	32	18	2	0
4	0	38	34	14	4	4
5	5	39	27	18	0	1
6	3	75	12	2	0	0
7	44	50	3	1	0	0
8	61	24	7	0	0	0
9	2	41	32	0	0	0
10	5	86	4	0	0	0
11	3	49	30	9	0	1
12	76	24	0	0	0	0
13	28	65	0	0	0	0
14	49	44	1	0	0	0
15	89	8	1	0	0	0
16	0	38	34	14	4	1
17	0	66	25	6	2	0
18	0	60	35	5	0	0
19	0	8	30	36	14	3
20	0	41	41	11	3	0
21	0	6	30	37	15	8
22	0	33	57	3	2	2
23	1	23	29	11	11	0
24	0	44	40	9	1	0
25	0	6	15	40	15	14
26	1	19	34	25	19	2
27	0	36	39	18	4	0
28	0	32	35	25	4	0
29	4	67	17	2	1	0
30	2	70	25	0	0	0

Quadro 2B - Resultados do acompanhamento da germinação de sementes das 30 famílias de *Parapiptadenia rigida* da coleção regional, até o sexto dia do teste. Valores em porcentagem

Famílias	Dias Consecutivos					
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o
1	7	77	0	0	0	0
2	3	84	10	1	0	0
3	0	54	39	4	1	0
4	0	37	55	4	2	0
5	0	66	6	0	0	0
6	0	58	13	1	0	0
7	0	43	1	0	0	0
8	0	11	19	0	2	0
9	0	78	5	0	0	0
10	0	46	28	1	0	0
11	0	51	34	2	2	0
12	0	88	0	0	0	0
13	0	62	25	2	1	0
14	0	89	1	0	0	0
15	3	80	3	0	2	0
16	0	78	3	0	0	0
17	0	70	4	0	3	0
18	0	20	4	0	0	0
19	3	78	2	0	0	0
20	2	53	3	0	0	0
21	0	66	1	0	0	0
22	0	66	4	3	0	0
23	0	58	1	1	0	0
24	0	70	0	0	0	0
25	0	58	6	6	2	0
26	0	96	0	0	0	0
27	35	8	1	0	0	0
28	0	61	28	2	1	0
29	0	71	0	0	0	0
30	15	18	0	0	0	0

APÊNDICE C

Quadro 1C - Número médio de alelos por loco polimórfico, porcentagem de locos polimórficos (critério de 95%) e heterozigosidades médias observada e esperada, para cada família da coleção regional e do pomar de sementes de *Parapiptadenia rigida*

Famílias	Número Médio de Alelos (A)		% de Locos Polimórficos (P)		Heterozigosidade Observados (Ho)		Heterozigosidade Esperada (He)	
	pomar	natural	pomar	natural	pomar	natural	pomar	natural
	(S.E.)	(S.E.)			(S.E.)	(S.E.)	(S.E.)	(S.E.)
01	2,3 (0,3)	2,0 (0,4)	100	75	0,40 (0,14)	0,14 (0,05)	0,34 (0,11)	0,13 (0,5)
02	2,5 (0,5)	2,3 (0,3)	100	75	0,25 (0,04)	0,54 (0,20)	0,28 (0,07)	0,13 (0,38)
03	2,5 (0,3)	1,8 (0,3)	100	75	0,31 (0,10)	0,46 (0,22)	0,30 (0,09)	0,11 (0,29)
04	2,0 (0,0)	2,0 (0,4)	100	75	0,37 (0,12)	0,25 (0,14)	0,29 (0,08)	0,10 (0,19)
05	2,3 (0,6)	2,0 (0,4)	75	75	0,23 (0,10)	0,21 (0,11)	0,23 (0,11)	0,08 (0,17)
06	1,5 (0,3)	2,0 (0,0)	50	100	0,16 (0,12)	0,35 (0,14)	0,15 (0,11)	0,09 (0,28)
07	1,8 (0,3)	2,3 (0,3)	75	100	0,15 (0,09)	0,48 (0,16)	0,13 (0,07)	0,38 (0,09)
08	2,0 (0,4)	2,0 (0,4)	75	75	0,14 (0,07)	0,31 (0,12)	0,15 (0,09)	0,32 (0,13)
09	2,3 (0,5)	2,3 (0,3)	75	50	0,29 (0,11)	0,28 (0,14)	0,24 (0,09)	0,23 (0,11)
10	1,8 (0,3)	2,3 (0,3)	75	100	0,17 (0,09)	0,51 (0,15)	0,16 (0,08)	0,42 (0,12)
11	2,8 (0,5)	1,8 (0,3)	100	75	0,46 (0,14)	0,29 (0,11)	0,36 (0,10)	0,24 (0,08)
12	1,8 (0,3)	2,0 (0,4)	75	75	0,24 (0,14)	0,17 (0,06)	0,25 (0,12)	0,16 (0,06)
13	2,5 (0,3)	1,8 (0,3)	100	75	0,39 (0,10)	0,10 (0,04)	0,37 (0,09)	0,16 (0,10)
14	2,0 (0,4)	1,3 (0,3)	75	25	0,35 (0,18)	0,11 (0,11)	0,25 (0,12)	0,09 (0,09)
15	2,3 (0,6)	2,0 (0,7)	50	50	0,27 (0,18)	0,22 (0,13)	0,20 (0,11)	0,19 (0,11)
16	2,3 (0,3)	1,3 (0,3)	100	25	0,21 (0,06)	0,02 (0,02)	0,19 (0,05)	0,02 (0,02)
17	2,0 (0,4)	2,0 (0,4)	75	75	0,43 (0,16)	0,32 (0,11)	0,34 (0,11)	0,30 (0,11)
18	1,8 (0,3)	2,0 (0,4)	75	75	0,36 (0,15)	0,17 (0,07)	0,30 (0,12)	0,18 (0,07)
19	1,8 (0,3)	2,3 (0,6)	50	75	0,13 (0,08)	0,46 (0,22)	0,13 (0,08)	0,34 (0,15)
20	1,8 (0,3)	1,8 (0,3)	50	50	0,12 (0,06)	0,24 (0,16)	0,11 (0,05)	0,18 (0,11)
21	1,8 (0,3)	1,8 (0,3)	25	50	0,20 (0,16)	0,20 (0,12)	0,15 (0,12)	0,16 (0,09)
22	1,8 (0,3)	2,3 (0,3)	50	75	0,09 (0,04)	0,27 (0,12)	0,08 (0,04)	0,24 (0,10)
23	2,3 (0,3)	2,0 (0,0)	75	25	0,40 (0,12)	0,21 (0,16)	0,31 (0,09)	0,15 (0,10)
24	2,3 (0,3)	1,8 (0,3)	75	50	0,19 (0,07)	0,14 (0,09)	0,25 (0,10)	0,12 (0,07)
25	2,3 (0,3)	1,5 (0,3)	75	25	0,34 (0,16)	0,08 (0,06)	0,27 (0,12)	0,13 (0,11)
26	2,0 (0,4)	1,8 (0,3)	75	50	0,25 (0,15)	0,17 (0,11)	0,20 (0,11)	0,15 (0,09)
27	2,0 (0,4)	1,5 (0,3)	75	50	0,21 (0,09)	0,10 (0,06)	0,18 (0,07)	0,09 (0,05)
28	1,3 (0,3)	1,8 (0,3)	25	75	0,09 (0,09)	0,20 (0,08)	0,07 (0,07)	0,18 (0,07)
29	2,3 (0,5)	2,3 (0,6)	75	75	0,34 (0,14)	0,32 (0,13)	0,28 (0,11)	0,27 (0,10)
30	2,3 (0,5)	1,8 (0,3)	75	75	0,25 (0,09)	0,44 (0,18)	0,25 (0,10)	0,31 (0,12)