

Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis*
Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação
e o melhoramento genético

Mating system in populations of *Cariniana legalis*
Mart. O. Ktze: implications for genetic
conservation and improvement

Alexandre Magno Sebbenn
Paulo Yoshio Kageyama
Ana Cristina Machado de Franco Siqueira
Antonio Carlos Scatena Zanatto

ABSTRACT: The mating system of three natural populations of the *Cariniana legalis* (Lecitidaceae), was estimate from isozymes date in sample individuals in the population and progenies test, implanted in compact families block design, in two sites from São Paulo State, Pederneiras Experimental Station and Luiz Antonio Experimental Station, properties of São Paulo Forest Institut (IFSP). The multilocos population outcrossing rate (\hat{t}_m) was high ($\geq 0,901$), suggesting that species has a mixed mating system, predominantly alogamus. The relatives outcrossing rate ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) was low (minimus 5,9%), but significant, showing the existence of the individuals relatives within populations. The individuals trees outcrossing rate vary within populations, indicating the presence of different levels of endogamy in the progenies. The correlation of selfing (\hat{r}_s) and the correlation of paternity (\hat{r}_p) showing that the progenies do not exclusively compost of half-sibs with was initially expected, but also for full sibs and self-crossing individuals. Corroborate with this result, was detected heterogeneous pool gene of polen and ovule and that deviation of Hardy-Weinberg Equilibrium was caused by preferential and relatives mating. Finally, the high outcrossing rate in populations evidence that the trials have potential for *ex situ* genetic conservation and genetic improvement.

KEYWORDS: *Cariniana legalis*, Mating system, Isozymes electrophoresis, Progenies test, Genetic conservation, Improvement

RESUMO: O sistema de cruzamento de três populações naturais de *Cariniana legalis* (Lecitidaceae) foi estimado a partir de dados de isoenzimas de indivíduos amostrados em um teste de progênie e populações, instalado no delineamento de blocos de famílias compactas, em dois locais do Estado de São Paulo, Estação Experimental de Pederneiras e Estação Experimental de Luiz Antonio, ambas de propriedade do Instituto Florestal de São Paulo (IFSP). A taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m) foi alta para as três populações ($\geq 0,901$), sugerindo que a espécie é de cruzamento misto preferencialmente alógama. A taxa de cruzamento entre aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) foi baixa (mínimo 5,9%), mas significativa, mostrando a existência de indivíduos aparentados dentro das populações que deram origem às progênie ensaiadas. A taxa de cruzamento individual por planta materna variou de 0,64 a 1,00, indicando que as

progênes apresentam diferentes graus de endogamia. A correlação de autofecundação (\hat{r}_s) e a correlação de cruzamento paterno (\hat{r}_p) indicaram que as progênes não são compostas exclusivamente de meios irmãos como inicialmente esperado, mas também por irmãos completos e indivíduos oriundos de autofecundação. Corroborando com este resultado, detectou-se que o conjunto gênico dos óvulos e do pólen eram heterogêneos e que os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, na maioria dos locos avaliados nas populações, foi causado por cruzamento entre aparentados e/ou preferenciais. Finalmente, as altas taxas de cruzamentos nas populações evidenciam que os ensaios apresentam potencial para a conservação *ex situ* e como populações base de recombinação para o melhoramento genético da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: *Cariniana legalis*, Taxa de cruzamento, Eletroforese de isoenzimas, Teste de progênes, Conservação e melhoramento genético

INTRODUÇÃO

Cariniana legalis Mart. O. Ktze (Lecitidaceae) ou jequitibá rosa é conhecida como uma das árvores gigantes da Floresta Atlântica, atingindo 60 m de altura e 4 m de diâmetro (DAP); contudo, usualmente, os indivíduos estão entre 25 e 35 m de altura e 60 a 100 cm de diâmetro. Ela habita o estrato superior da Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica), formação Baixo-Montana e Floresta Estacional Semidecidual, entre as latitudes 08° S. (PE) a 23° S. (SP) e entre as altitude de 30 a 1.000 m, onde ocorre em pequenos grupos nas baixadas e encostas úmidas. A espécie é encontrada nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia, Alagoas e Pernambuco (Carvalho, 1994). *C. legalis* apresenta características de espécie secundária tardia e no estágio sucessional não habita pastagens, sendo essencialmente da floresta. Trata-se de uma espécie perenifolia, semicaducifolia, com flores hermafroditas, polinizadas por abelhas e com dispersão de sementes por anemocoria. Vale ressaltar que a espécie pode ultrapassar 500 anos de idade. Sua madeira é leve e muito utilizada para tabuados em geral, carpintaria civil, saltos de sapato, tonéis e mobiliário em geral (Carvalho, 1994). Entretanto, apesar de sua grande utilidade, a espécie encontra-se em perigo de extinção, restando apenas um reduzido número de exemplares em ocorrência natural (Siqueira

et al., 1986; FAO, 1996). Apesar disso, muito pouco tem sido feito para salvar a espécie da extinção, sendo que a conservação *in situ* tem sido realizada nas estações ecológicas e reservas públicas. Quanto à conservação *ex situ*, esta é deficiente, sendo que existem apenas duas populações base de conservação *ex situ* implantadas no Estado de São Paulo pelo Instituto Florestal de São Paulo (IFSP). Plantios comerciais para fins de exploração são raros e não existe um programa específico de conservação *in situ* e melhoramento genético de *C. legalis*.

Contudo, para efetivação de qualquer programa de conservação e melhoramento genético de uma espécie, é fundamental o conhecimento dos níveis e da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de suas populações. Por sua vez, esta estrutura genética é o resultado da interação de vários fatores reprodutivos e evolutivos (seleção, deriva genética, fluxo gênico). De fundamental importância, é conhecer o sistema de cruzamento da espécie, dado este que determina como os genes são transmitidos de uma geração para outra e como são reorganizados nos indivíduos, portanto, também determina sua estrutura genética espacial e temporal (Ritland e Jain, 1981; Brown, 1989; Murawski et al., 1994). Devido a isso, o sistema de cruzamento deve ser o primeiro passo a ser seguido para o conhecimento genético de uma espécie, quando

se objetiva sua conservação e seu melhoramento genético.

A maioria dos estudos sobre o sistema de cruzamento em espécies arbóreas tem sido realizada em populações naturais, utilizando-se isoenzimas. Alguns trabalhos, também têm sido feitos em pomares de semente, principalmente com espécies temperadas, visando conhecer sua influência na endogamia, depressão por endogamia, adaptação, ligação gênica e contaminação de pólen em pomares de sementes (Friedman e Adams, 1984; Ritland e El-Kassaby, 1985; El-Kassaby et al., 1986a; 1986b; Wang e Lin, 1997). Todavia, poucos trabalhos sobre a taxa de cruzamento foram realizados em testes de progênies de essências florestais, sendo que nestes casos, as inferências sobre o sistema de reprodução têm sido obtidas a partir da relação entre a variância fenotípica dentro de parcelas e a variância genética entre progênies ($\hat{\sigma}_d^2 / \hat{\sigma}_p^2$), estimadas através de caracteres quantitativos (Siqueira et al., 1993; Sebbenn et al., 1998; Sebbenn et al., 1999).

Porém, esta forma de avaliação do sistema de cruzamento é limitada porque não informa sobre a magnitude da taxa de cruzamento, presença de cruzamento entre aparentados, taxa de autofecundação etc. Todavia, tais informações podem ser facilmente obtidas, usando-se marcadores genéticos como isoenzimas (Clegg, 1980; Weir, 1996). Mas, trabalhos sobre o sistema de cruzamento em testes de progênies, baseados em dados de isoenzimas, são raros, podendo-se citar os estudos de Muona et al., (1987) com *Pinus sylvestris* L., Bush e Smouse (1991) com *Pinus taeda* L. e Burgess et al., (1995) com *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden.

O objetivo deste trabalho foi estudar o sistema de cruzamento de três populações naturais de *C. legalis*, a partir de dados de eletroforese de isoenzimas obtidos de um teste combinado de progênies e populações, repetido em dois locais do Estado de São Paulo, visando fornecer subsídios para estratégias de conservação e melhoramento genético da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

No ano de 1981, o Instituto Florestal de São Paulo coletou sementes de polinização aberta de *C. legalis*, em três populações naturais do Estado de São Paulo: Campinas (Bosque dos Jequitibás - Lat. 22°55' S., Long. 47°03' W., altitude 652 a 681 m, área \cong 10 ha), Piracicaba (Estação Ecológica de Ibicatu - Lat. 22°47' S., Long. 47°49' W., altitude 500 m, área \cong 76 ha) e Santa Rita do Passa Quatro (Parque Estadual de Vassununga - Lat. 21°41' S., Long. 47°39' W., altitude de 520 a 700 m, área \cong 191,0 ha). Na População Jequitibás foram coletadas sementes de 17 árvores, na Ibicatu de 16 e na Vassununga de 22, sendo que nas populações Jequitibás e Ibicatu, todas as árvores foram amostradas. Em 1982 essas progênies foram plantadas na Estação Experimental de Peder-

neiras (Lat. 22°22' S., Long. 48°44' W., altitude 500 m) e Estação Experimental de Luiz Antonio (Lat. 21°40' S., Long. 47°49' W., altitude 550 m), no delineamento de blocos de famílias compactas, com 6 repetições, sub-parcelas lineares com 5 plantas e uma bordadura externa de duas linhas. O espaçamento utilizado foi o 3,0 x 2,0 metros.

Para a caracterização da taxa de cruzamento, no ano de 1999, realizou-se uma amostragem de tecidos foliares de 1.295 árvores, nos dois ensaios. Em cada ensaio, foram selecionadas as 30 melhores plantas de cada população, com base no DAP, utilizando-se o índice de seleção multi-efeito (Resende e Higa, 1994), totalizando 180 árvores. Da mesma forma, foram selecionadas as 30 plantas de me-

nor DAP por população/local, também totalizando 180 árvores. O restante das plantas (1.295 - 360 = 935), foram amostradas aleatoriamente dentro dos ensaios, procurando-se genotipar uma média de 20 plantas por progênie. O número de indivíduos amostrados por progênie variou de 9 a 31, com média de 24,1 para a população Campinas, 22,7 para Piracicaba e 19,8 para Vassununga (Ver Tabela 3). As folhas foram coletadas e embaladas em sacos plásticos, devidamente identificadas por bloco, população, progênie e indivíduo na parcela e levadas para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, para as análises de eletroforese de isoenzimas. A eletroforese foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de 2/3 de amido de milho (penetrose 30) a 13%, combinado com 1/3 de amido de batata (Sigma). As “corridas” foram realizadas em geladeira, com temperatura de 5° C, mantendo-se a corrente constantes de 35 miliampères nos eletrodos para o tampão Tris Citrato (TC, pH 7,5 - Soltis et al., 1983) e de 30 miliampères para o sistema Citrato Morfolina (CM, pH 6.1 - Clayton e Tretiak, 1972). As enzimas foram extraídas de tecidos foliares de plantas com 17 anos de idade, empregando-se aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP 40), 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP-60) e 200 microlitros da solução de extração número 1 de Alfenas (1998), alterada pela ausência de Mercaptoetanol. As isoenzimas reveladas foram: Fosfatase Ácida (ACP-E.C. 3.1.3.2.), Alfa-Esterase (a-EST-E.C. 3.1.1.1), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH-E.C. 1.1.1.44), Fosfogluose Isomerase (PGI-E.C. 5.3.1.9), Isocitrato Desidrogenase (IDH-E.C. 1.1.1.42), Malato Desidrogenase (MDH-E.C. 1.1.1.37), Peroxidase (PRX-E.C. 1.11.1.7), Xiquimato Desidrogenase (SKDH-E.C. 1.1.1.25) e Glucose 6 Fosfato Desidrogenase (G6PDH-E.C. 1.1.1.49.). As receitas de revelação das isoenzimas encontram-se em Alfenas (1998). Os

sistemas ACP, PO, IDH, G6DH e SKDH foram revelados no tampão de eletrodo e gel TC e a PGI, MDH, a-EST e 6PGDH no tampão CM.

O sistema de reprodução das populações de *C. legalis* foi analisado com base no modelo de cruzamento misto de Ritland e Jain (1981), com o auxílio do programa “Multilocus MLTR” de Ritland (1997). Estimaram-se: 1) a taxa de cruzamento multilocus da população (\hat{t}_m), pelo método de máximas esperanças (Expectation-Maximization - EM); 2) a taxa de cruzamento média unilocus da população (\hat{t}_s); 3) a taxa de cruzamento entre aparentados ($\hat{t}_p = \hat{t}_m - \hat{t}_s$); 4) as frequências alélicas dos óvulos e do pólen (o e p), também pelo método de máximas esperanças; 5) a taxa de cruzamento individual por árvore materna; 6) a correlação de autofecundação entre dois filhos ou a proporção média de progênies de autofecundação dentro das progênies, ou ainda, a probabilidade que em uma progênie onde existe um indivíduo gerado por autofecundação, encontre-se outro gerado da mesma forma (\hat{r}_s) e; 7) a correlação de paternidade de cruzamento entre dois irmãos, ou a proporção de irmãos completados entre irmãos de cruzamento dentro das progênies (\hat{r}_p). O modelo de cruzamento misto assume que as progênies resultam de uma mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundação, cujas pressuposições básicas são: a) que o conjunto de pólen é homogêneo para o cruzamento de todos os genótipos maternos; b) que os alelos de diferentes locos segregam independentemente e; c) que os locos avaliados não sofreram seleção ou mutação entre o evento reprodutivo e a análise dos indivíduos (Ritland e Jain, 1981; Ritland, 1990). Para estimar o erro padrão da média de \hat{t}_m , \hat{t}_s , \hat{t}_p , \hat{r}_s , \hat{r}_p , o e p , o programa utilizou o procedimento de reamostragem do tipo *bootstrap*, onde a unidade de amostragem foram as plantas dentro das progênies para a taxa de cruzamento individual por árvore materna e progênies para taxa de cruzamento média das populações. Utilizaram-se 1.000 reamostragens

entre e dentro de progênies. O teste de cruzamentos aleatórios foi realizado pelo teste de homogeneidade das frequências alélicas dos óvulos de pólen e pelo teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). O teste de homogeneidade foi realizado através da estimativa \hat{F}_{ST} de Wright (1965), utilizando-a apenas como uma medida de divergência entre frequências alélicas. Para testar a significância de \hat{F}_{ST} , para cada loco, aplicou-se o teste de qui-quadrado $\chi^2 = 2n \hat{F}_{ST} (k-1)$, GL = $(k-1)(s-1)$, proposto por Workman e Niswander (1970), onde: n = é o número de gametas nos dois grupos (pólen e óvulos), k = número de alelos e s = número de grupos (2 - pólen e óvulo). O teste de aderência dos locos ao modelo de EHW, na populações, foi realizado através do teste exato de Fisher, obtido a partir do programa BIOSYS-1 (Swofford e Selander, 1989). O teste para separar efeitos do sistema de reprodução (autofecundação, cruzamento entre aparentados ou preferências) de fatores evolutivos (seleção e deriva genética) foi o teste de Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW). O teste de EEW só foi realizado em locos que apresentaram desvios do EHW e no mínimo três alelos (número mínimo de alelos que permita graus de liberdade suficientes para testar as hipóteses). O teste χ^2 para verificar a aderência dos genótipos observados aos esperados pelo EEW, foi estimado conforme Vencovsky (1994): $\chi^2 = \sum (n_o - n_e)^2 / n_e$; onde: n_o = frequência genotípica observada; n_e = frequência genotípica esperada pelo EEW. Esse teste considera o índice de fixação de Wright (\hat{f}) para as estimativas das

frequências genotípicas esperadas. As frequências genotípicas esperadas foram obtidas segundo Weir (1996): $P_{ii} = p_i^2 + \hat{f} p_i(1 - p_i)$ = frequência genotípica esperada de homozigotos; $P_{ij} = 2p_i p_j (1 - \hat{f})$ = frequência genotípica esperada de heterozigotos, onde: \hat{f} = índice de fixação de Wright; p_i = frequência do *i*-ésimo alelo. Os graus de liberdade foram dados por: GL = $([n^\circ \text{ de classes genotípicas} - 1] - [n^\circ \text{ de alelos} - 1] - 1)$, sendo um grau de liberdade perdido devido ao \hat{f} (Vencovsky, 1994). Como pode ser observado, devido à computação dos graus de liberdade, o teste só pode ser aplicado em locos que possuam no mínimo 3 alelos. O \hat{f} foi estimado em nível de locos e média entre locos, pelas expressões:

$$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e} \text{ (nível de loco);}$$

$$\hat{f} = 1 - \frac{\sum \hat{H}_o}{\sum \hat{H}_e} \text{ (média ponderada entre locos).}$$

O teste para verificar se o valor de \hat{f} era estatisticamente diferente de zero, em nível de loco, foi o $\chi^2 = n \hat{f}^2 (k-1)$, com GL = $[k(k-1)]/2$, onde: \hat{f} = índice de fixação, n = número total de indivíduos amostrados e k é o número de alelos (Li e Horvitz, 1953). Para verificar se os valores médios de \hat{f} , eram diferentes de zero, utilizou-se um método de reamostragem "bootstrap", com 10.000 repetições sobre os locos, a um intervalo de confiança de 95% de probabilidade. O "bootstrap" foi obtido através do programa GDA de Lewis e Zaykin (1999).

RESULTADOS

Os nove sistemas isoenzimáticos avaliados revelaram dezessete zonas de atividade, sendo 14 passíveis de interpretação. O sistema ACP apresentou três zonas de atividade, mas apenas a região mais anódica apresentou-se passível de interpretação. Esta região foi interpretada

como um loco polimórfico, composta por uma enzima monomérica, com dois alelos. A α EST apresentou duas zonas de atividade, interpretadas como locos polimórficos distintos de expressão monoméricas, com quatro alelos. A PGI e a MDH também apresentaram duas zonas de ati-

vidade, interpretadas como locos polimórficos, compostas por enzimas de expressão dimérica, com até quatro alelos. A PRX apresentou quatro locos polimórficos de expressão monomérica, no entanto, a enzima mais anódica não foi passível de interpretação devido à baixa constância e qualidade de resolução. Na PRX o loco 1 e 2 apresentaram três alelos e o loco 3 quatro alelos. Os sistemas 6PGDH, SKDH, G6PDH e IDH apresentaram apenas uma zona de atividade, contudo polimórficas. O três primeiros, apresentaram enzimas de expressão monoméricas e a última, dimérica. O sistema 6PGDH apresentou três alelos e a SKDH, G6PDH e IDH apresentaram dois alelos.

O sistema de reprodução das populações de *C. legalis* foi inicialmente caracterizado pelo teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), através do teste exato de Fisher (Tabela 1). Este teste é o mais adequado quando existem fre-

quências esperadas inferiores a 5%. O teste de Fisher revelou desvios das frequências genotípicas observadas das esperadas pelo modelo de EHW, em 71,4% dos locos na população Jequitibás, 85,7% na Ibicatu e 78,6% na Vassununga. Desvios do EHW podem ser causados pelo sistema de reprodução ou por fatores evolutivos como seleção, migração, mutação ou deriva genética. O teste de Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW) permite conhecer se os desvios do teste de EHW foram causados pelo sistema de reprodução ou devido a fatores evolutivos.

Na população Jequitibás, Ibicatu e Vassununga cinco dos sete (α Est-2, Pgi-2; Prx-1, Prx-2 e Prx-3), três dos seis (Pgi-2, Prx-2 e Prx-3) e quatro dos sete locos (α Est-2, Pgi-2, Prx-2 e Prx-3) avaliados, respectivamente, apresentaram desvio do modelo de EEW, indicando

Tabela 1. Probabilidades do teste exato de Fisher para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e teste de qui-quadrado (c^2) para o teste de Equilíbrio de Endogamia de Wright (EEW) em populações de *C. legalis*.

(Probability of Fisher exact test for the Hardy-Weinberg Equilibrium (EHW) and test of chi-square (c^2) for Wright Endogamy Equilibrium (EEW) in populations of *C. legalis*).

Loco	População					
	Jequitibás		Ibicatu		Vassununga	
	EHW (P)	EEW (c^2)	EHW (P)	EEW (c^2)	EHW (P)	EEW (c^2)
Acp-3	0,000 ** (1)	—	0,000 ** (1)	—	0,000 ** (1)	—
Est-1	0,452 (6)	—	0,405 (6)	—	0,168 (6)	—
Est-2	0,000 ** (3)	21,08 ** (2)	0,005 ** (6)	1,49 (5)	0,049 * (6)	17,47 ** (5)
Pgi-1	0,734 (1)	—	0,000 ** (3)	4,27 (5)	0,751 ** (1)	—
Pgi-2	0,000 ** (1)	31,14 ** (2)	0,000 ** (3)	17,59 ** (5)	0,000 ** (3)	11,92 ** (2)
Mdh-1	0,036 * (3)	0,03 (2)	0,229 (1)	—	0,032 (3)	1,44 (2)
Mdh-2	0,042 * (3)	1,75 (2)	0,002 * (1)	—	0,134 (3)	—
Prx-1	0,000 ** (3)	6,71 * (2)	0,000 ** (3)	—	0,000 ** (3)	0,98 (2)
Prx-2	0,000 ** (1)	21,36 ** (2)	0,000 ** (3)	14,95 ** (2)	0,000 ** (3)	7,43 ** (2)
Prx-3	0,000 ** (3)	8,59 ** (2)	0,000 ** (6)	13,96 ** (5)	0,000 ** (3)	22,55 ** (5)
6Pgdh-1	0,077 (3)	—	0,000 ** (3)	0,50 (2)	0,000 ** (3)	2,31 (2)
Skdh-1	0,000 ** (1)	—	0,000 ** (1)	—	0,000 ** (1)	—
G6pdh-1	0,642 (10)	—	0,008 ** (1)	—	0,241 ** (1)	—
Idh-1	0,000 ** (1)	—	0,000 ** (1)	—	0,000 ** (1)	—

*, **: significativo em nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente; (): graus de liberdade.

do a atuação de forças evolutivas, possivelmente, seleção para heterozigotos.

O teste de homogeneidade das frequências alélicas dos óvulos e do pólen (Tabela 2) mostraram diferenças significativas para quase todos os locos avaliados, exceção para o loco Acp-3 na população Jequitibás, Skdh-1 na Ibicatu e Acp-3 e Skdh-1 na Vassununga, sugerindo que a distribuição do pólen não foi homogênea para os cruzamentos individuais.

A heterogeneidade nas frequências alélicas do conjunto gênico materno e paterno pode ter quatro origens:

- ✓ diferenças na função masculina e feminina das plantas (apesar da espécie ter flores hermafroditas é possível que os órgãos masculinos e femininos entrem em reprodução em diferentes fases na mesma planta);
- ✓ imigração de pólen de fora das populações amostradas (não foram detectados alelos privados entre os dois conjuntos gênicos [pólen e óvulos], portanto não há indícios de contaminação de pólen de outras populações);
- ✓ seleção entre o período de polinização e a análise de isoenzimas (hipótese mais provável dado que decorreram 17 anos entre o evento reprodutivo e a revelação das isoenzimas). Ressalta-se que a hipótese de seleção é fundamentada na hipótese de provável ligação entre locos isoenzimáticos e locos adaptativos;
- ✓ devido à amostragem não representativa das árvores maternas (pouco provável porque todas as árvores foram amostradas nas populações Ibicatu e Jequitibás). Contudo, segundo Ritland e Jain (1981), violações da pressuposição de homogeneidade das frequências alélicas dos óvulos e do pólen têm pouco efeito sobre a estimativa da taxa de cruzamento multilocos da população (\hat{t}_m) quando um grande número de locos é usado para as estimativas, como por exemplo, mais de quatro ou cinco.

Logo, tendo em vista que foram utilizados 14 locos para as estimativas multilocos, acredita-se que os resultados obtidos são robustos.

A taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m) foi alta e significativamente diferente de 1,0 para todas as populações, variando de 0,901 a 0,990, mostrando que a espécie se reproduz por cruzamento misto predominantemente por alogamia (Tabela 3). A taxa de cruzamento unilocos (\hat{t}_s) foi significativamente menor que a \hat{t}_m em todas as populações (mínimo 0,830), indicando uma alta proporção de cruzamentos entre indivíduos não aparentados nas populações. A taxa de cruzamento entre aparentados (\hat{t}_p) variou de 0,059 a 0,091, demonstrando que existe parentesco dentro das populações naturais. A julgar pelo erro padrão da média da estimativa de \hat{t}_p , pode-se considerar que os cruzamentos entre aparentados foram estatisticamente significativos. A correlação na estimativa de $t(\hat{r}_s)$ ou a probabilidade de encontrar-se um indivíduo gerado por autofecundação em uma progênie onde existe outro também gerado por autofecundação, variou entre as populações de 0,076 a 0,101, revelando a presença de indivíduos advindos de autofecundação, dentro das progênies, nas três populações.

A correlação da estimativa de $p(\hat{r}_p)$ ou a probabilidade de encontrar-se indivíduos irmãos completos no conjunto das progênies de cruzamento foi alta, variando de 0,212 a 0,324, sugerindo a presença de cruzamentos preferenciais dentro das populações, portanto, também de irmãos completos dentro das progênies. Nenhum dos parâmetros do sistema de reprodução estimados diferiram estatisticamente entre a população Jequitibás e Ibicatu (populações pequenas com 17 e 16, indivíduos, respectivamente), com exceção da \hat{t}_p . Porém, os parâmetros \hat{t}_m , \hat{t}_s e \hat{r}_p diferiram destas duas populações em relação a Vassununga. Apenas os parâmetros \hat{t}_p e \hat{r}_s não foram estatisticamente significativas entre as populações.

A taxa de cruzamento individual por árvore materna (Tabela 3), foi alta para a maioria dos cruzamentos, não variando muito dentro das populações. Na população Jaquitibás, seis das

Tabela 2. Divergência genética entre frequências alélicas dos óvulos e do pólen (\hat{F}_{ST}) e teste de qui-quadrado (c^2) em populações de *C. legalis*.(Genetic divergence between ovule and pollen allele frequencies (\hat{F}_{ST}) and test of chi-square (c^2) in populations of *C. legalis*).

Loco	Alelo	Pop. Jequitibás				Pop. Ibicatu				Pop. Vassununga			
		Pólen	Óvulo	\hat{F}_{ST}	χ^2	Pólen	Óvulo	\hat{F}_{ST}	χ^2	Pólen	Óvulo	\hat{F}_{ST}	χ^2
Acp3	1	0,879 (0,022)	0,853 (0,054)		[1]	0,829 (0,040)	0,781 (0,074)		[1]	0,846 (0,041)	0,864 (0,056)		[1]
	2	0,121 (0,022)	0,147 (0,054)	0,006	2,21	0,171 (0,040)	0,219 (0,074)	0,015	5,58**	0,154 (0,041)	0,136 (0,056)	0,003	1,12
Est1	1	0,196 (0,039)	0,389 (0,049)			0,161 (0,038)	0,364 (0,052)			0,211 (0,025)	0,304 (0,050)		
	2	0,738 (0,039)	0,556 (0,049)			0,777 (0,038)	0,576 (0,049)			0,712 (0,024)	0,652 (0,050)		
	3	0,058 (0,013)	0,028 (0,001)		[3]	0,057 (0,010)	0,030 (0,021)		[3]	0,069 (0,012)	0,022 (0,001)		[3]
	4	0,002 (0,004)	0,028 (0,001)	0,184	220,18 **	0,005 (0,003)	0,030 (0,001)	0,226	259,97 **	0,008 (0,004)	0,022 (0,001)	0,063	82,19 **
Est2	1	0,259 (0,025)	0,441 (0,037)			0,224 (0,028)	0,364 (0,050)			0,278 (0,024)	0,422 (0,047)		
	2	0,638 (0,029)	0,529 (0,031)			0,679 (0,026)	0,545 (0,040)			0,609 (0,022)	0,533 (0,047)		
	3	0,103 (0,004)	0,029 (0,019)		[2]	0,092 (0,018)	0,061 (0,036)		[3]	0,103 (0,013)	0,022 (0,014)		[3]
	4	0,000	0,000	0,142	112,76 **	0,005 (0,003)	0,030 (0,001)	0,110	126,39 **	0,010 (0,006)	0,022 (0,001)	0,119	154,72 **
Pgi1	1	0,875 (0,024)	0,912 (0,043)			0,906 (0,014)	0,824 (0,051)			0,857 (0,017)	0,891 (0,047)		
	2	0,125 (0,024)	0,088 (0,043)			0,080 (0,011)	0,118 (0,051)			0,138 (0,017)	0,065 (0,044)		
	3	0,000	0,000		[1]	0,011 (0,006)	0,29 (0,001)		[3]	0,003 (0,002)	0,022 (0,001)		[3]
	4	0,000	0,000	0,014	5,46*	0,003 (0,002)	0,029 (0,001)	0,067	75,95 **	0,003 (0,002)	0,022 (0,001)	0,066	85,88 **
Pgi2	1	0,303 (0,022)	0,486 (0,010)			0,274 (0,029)	0,424 (0,041)			0,291 (0,034)	0,489 (0,009)		
	2	0,620 (0,023)	0,486 (0,010)		[2]	0,675 (0,031)	0,545 (0,041)		[2]	0,660 (0,034)	0,489 (0,009)		[2]
	3	0,078 (0,011)	0,029 (0,001)	0,131	105,23 **	0,051 (0,012)	0,030 (0,001)	0,090	68,85 **	0,049 (0,008)	0,022 (0,001)	0,153	131,76 **
Mdh1	1	0,172 (0,029)	0,429 (0,040)			0,181 (0,020)	0,469 (0,030)			0,320 (0,096)	0,356 (0,083)		
	2	0,815 (0,028)	0,543 (0,040)		[2]	0,819 (0,020)	0,531 (0,030)		[1]	0,670 (0,096)	0,622 (0,083)		[2]
	3	0,012 (0,005)	0,029 (0,001)	0,339	277,60 **	0,000	0,000	0,378	145,94 **	0,010 (0,004)	0,022 (0,001)	0,010	8,66 *
Mdh2	1	0,753 (0,044)	0,657 (0,062)			0,830 (0,020)	0,594 (0,050)			0,827 (0,021)	0,578 (0,038)		
	2	0,240 (0,042)	0,314 (0,062)		[2]	0,170 (0,020)	0,406 (0,050)		[1]	0,159 (0,020)	0,400 (0,038)		[2]
	3	0,007 (0,004)	0,029 (0,001)	0,050	40,61 **	0,000	0,000	0,272	104,57 **	0,014 (0,005)	0,022 (0,001)	0,247	214,72 **

(): erro padrão da média; [] graus de liberdade; **: significativo a nível de 1% de probabilidade.

Tabela 2-Continuação. Divergência genética entre frequências alélicas dos óvulos e do pólen (\hat{F}_{ST}) e teste de qui-quadrado (c^2) em populações de *C. legalis*.

(Genetic divergence between ovule and pollen allele frequencies (\hat{F}_{ST}) and test of chi-square (c^2) in populations of *C. legalis*).

Loco	Alelo	Pop. Jequitibás				Pop. Ibicatu				Pop. Vassununga			
		Pólen	Óvulo	\hat{F}_{ST}	χ^2	Pólen	Óvulo	\hat{F}_{ST}	χ^2	Pólen	Óvulo	\hat{F}_{ST}	χ^2
Prx1	1	0,847 (0,029)	0,686 (0,064)			0,885 (0,028)	0,656 (0,063)			0,864 (0,019)	0,600 (0,043)		
	2	0,151 (0,029)	0,286 (0,064)		[2]	0,115 (0,028)	0,344 (0,063)		[1]	0,131 (0,018)	0,378 (0,044)		[2]
	3	0,002 (0,002)	0,029 (0,001)	0,149	121,90 **	0,000	0,000	0,297	114,18 **	0,005 (0,003)	0,022 (0,001)	0,401	348,69 **
Prx2	1	0,534 (0,070)	0,529 (0,051)			0,653 (0,040)	0,625 (0,067)			0,564 (0,034)	0,711 (0,060)		
	2	0,381 (0,066)	0,441 (0,056)		[2]	0,296 (0,034)	0,281 (0,073)		[2]	0,393 (0,033)	0,267 (0,060)		[2]
	3	0,085 (0,012)	0,029 (0,020)	0,035	28,74 **	0,051 (0,012)	0,094 (0,047)	0,016	12,32 **	0,043 (0,010)	0,022 (0,001)	0,021	18,07 **
Prx3	1	0,633 (0,072)	0,676 (0,078)			0,662 (0,069)	0,706 (0,072)			0,883 (0,015)	0,534 (0,076)		
	2	0,337 (0,070)	0,294 (0,080)			0,295 (0,070)	0,235 (0,071)			0,099 (0,012)	0,413 (0,077)		
	3	0,030 (0,008)	0,029 (0,020)		[2]	0,040 (0,010)	0,029 (0,001)		[3]	0,018 (0,006)	0,022 (0,001)		[3]
	4	0,000	0,000	0,008	6,78 **	0,003 (0,002)	0,029 (0,001)	0,038	43,32 **	0,008 (0,007)	0,022 (0,001)	0,017	21,14 **
6Pgd1	1	0,176 (0,024)	0,057 (0,034)			0,168 (0,024)	0,152 (0,057)			0,286 (0,024)	0,111 (0,043)		
	2	0,814 (0,024)	0,914 (0,034)		[2]	0,829 (0,024)	0,818 (0,057)		[1]	0,714 (0,024)	0,867 (0,043)		[1]
	3	0,010 (0,005)	0,029 (0,001)	0,121	96,39 *	0,003 (0,002)	0,030 (0,001)	0,024	18,06 **	0,015 (0,008)	0,022 (0,01)	0,024	21,15 **
Skdh1	1	0,288 (0,049)	0,235 (0,084)		[1]	0,430 (0,083)	0,500 (0,063)		[1]	0,478 (0,042)	0,545 (0,077)		[1]
	2	0,712 (0,049)	0,765 (0,084)	0,015	5,89 **	0,570 (0,083)	0,500 (0,063)	0,020	7,15	0,522 (0,042)	0,455 (0,077)	0,003	1,18
G6pd1	1	0,894 (0,015)	0,971 (0,021)		[1]	0,883 (0,021)	0,844 (0,058)		[1]	0,905 (0,017)	0,987 (0,001)		[1]
	2	0,106 (0,015)	0,029 (0,021)	0,094	38,05 **	0,117 (0,021)	0,156 (0,058)	0,013	4,68 **	0,095 (0,017)	0,022 (0,001)	0,196	84,09 **
ldh1	1	0,724 (0,053)	0,794 (0,059)		[1]	0,787 (0,034)	0,688 (0,076)		[1]	0,866 (0,019)	0,705 (0,066)		[1]
	2	0,276 (0,053)	0,206 (0,059)	0,027	10,66 **	0,213 (0,034)	0,313 (0,076)	0,051	18,23 **	0,134 (0,019)	0,295 (0,066)	0,000	0,02

(): erro padrão da média; [] graus de liberdade; **: significativo a nível de 1% de probabilidade.

Tabela 3. Taxa de cruzamento individual por progênie e em populações de *C. legalis*. (Individual progenie outcrossing rate and in populations of *C. legalis*).

(Taxa de cruzamento individual por progênie e em populações de *C. legalis*. (Individual progenie outcrossing rate and in populations of *C. legalis*).

Taxa de Cruzamento	Populações		
	Jequitibás	Ibicatu	Vassununga
Progênie 1	1,00 (0,02) - [23]	1,00 (0,00) - [30]	0,67 (0,16) - [9]
Progênie 2	1,00 (0,00) - [19]	0,94 (0,07) - [26]	0,93 (0,06) - [22]
Progênie 3	1,00 (0,00) - [28]	0,96 (0,05) - [23]	0,64 (0,16) - [22]
Progênie 4	0,97 (0,05) - [25]	1,00 (0,00) - [27]	0,95 (0,06) - [21]
Progênie 5	0,92 (0,07) - [24]	1,00 (0,04) - [20]	0,90 (0,09) - [16]
Progênie 6	1,00 (0,01) - [17]	1,00 (0,00) - [31]	0,81 (0,12) - [20]
Progênie 7	1,00 (0,00) - [27]	0,89 (0,09) - [22]	0,94 (0,07) - [13]
Progênie 8	1,00 (0,02) - [30]	0,92 (0,10) - [23]	0,84 (0,12) - [23]
Progênie 9	0,99 (0,04) - [28]	1,00 (0,00) - [27]	1,00 (0,00) - [21]
Progênie 10	0,98 (0,04) - [20]	0,98 (0,03) - [24]	1,00 (0,07) - [14]
Progênie 11	1,00 (0,00) - [24]	0,87 (0,10) - [22]	0,93 (0,07) - [13]
Progênie 12	1,00 (0,00) - [21]	0,94 (0,10) - [21]	1,00 (0,00) - [17]
Progênie 13	1,00 (0,00) - [17]	1,00 (0,00) - [22]	0,90 (0,07) - [25]
Progênie 14	1,00 (0,00) - [31]	1,00 (0,00) - [25]	1,00 (0,00) - [16]
Progênie 15	0,99 (0,03) - [28]	0,91 (0,07) - [28]	0,91 (0,14) - [20]
Progênie 16	0,96 (0,07) - [27]	0,96 (0,05) - [15]	1,00 (0,02) - [22]
Progênie 17	1,00 (0,04) - [21]	—	0,81 (0,14) - [20]
Progênie 18	—	—	1,00 (0,00) - [25]
Progênie 19	—	—	0,86 (0,11) - [22]
Progênie 20	—	—	0,96 (0,08) - [26]
Progênie 21	—	—	0,99 (0,07) - [25]
Progênie 22	—	—	1,00 (0,04) - [24]
Entre não aparentados (\hat{t}_s)	0,899 (0,016)	0,916 (0,014)	0,830 (0,032)
Entre não aparentados + aparentados (\hat{t}_m)	0,990 (0,009)	0,976 (0,011)	0,901 (0,025)
Entre aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$)	0,091 (0,012)	0,059 (0,011)	0,070 (0,025)
Taxa de autofecundação (\hat{S})	0,001	0,024	0,099
Correlação da estimativa de t (\hat{r}_s)	0,101 (0,005)	0,093 (0,008)	0,076 (0,009)
Correlação da estimativa de p (\hat{r}_p)	0,324 (0,045)	0,295 (0,045)	0,212 (0,033)

(): erro padrão da média; []: número de indivíduos amostrados na progênie.

17 progênies avaliadas apresentaram valores inferiores a 1,0, contudo, a julgar pelo erro padrão da média entre locos; apenas a progênie 5 apresentou valores estatisticamente menor do que

1,0. Na população Ibicatu, nove das dezesseis progênies avaliadas apresentaram valores inferiores a 1,0, com três valores significativos, sendo o menor valor de 0,87. Na população

Vassununga, quinze das vinte e duas progênies avaliadas apresentaram valores diferentes da unidade, sendo nove significativamente diferentes de 1,0 e o menor valor estimado de 0,64.

O índice de fixação nas progênies (\hat{f}) variou consideravelmente entre locos dentro das populações, porém, esta variação pode ser atribuída a erros de amostragem, dado que o número de indivíduos genotipados não permitiu que fossem encontrados indivíduos em todas as classes genotípicas possíveis (Tabela 4). Para a média entre locos, o \hat{f} foi alto e significativamente diferente de zero para as três populações (média entre populações de 0,237),

contudo, não foi estatisticamente diferente entre populações. A estimativa do coeficiente de endogamia f_p da geração parental (Tabela 3) evidenciou a ausência de endogamia nas populações naturais. Logo, a endogamia observada nas progênies não ocorreu pelo acúmulo de endogamia de diferentes gerações, mas sim, possivelmente, devido à taxa de autofecundação e aos cruzamentos entre aparentados. O parentesco entre os progenitores aumenta a endogamia e parentesco entre as progênies acima do esperado em populações de cruzamentos aleatórios, sem parentesco na geração parental.

Tabela 4. Tamanho da amostra (n) e índice de fixação de Wright (\hat{f}) em populações de *C. legalis*.

(Sample size (n) and Wright index fixation (\hat{f}) in populations of the *C. legalis*).

	População								
	Jequitibás			Ibicatu			Vassununga		
	n	\hat{f}		n	\hat{f}		n	\hat{f}	
Acp-3	379	0,292	**	380	0,336	**	430	0,461	**
Est-1	399	0,070	**	384	0,055	**	435	0,078	**
Est-2	398	0,245	**	383	0,154	**	435	0,147	**
Pgi-1	392	0,015	*	380	0,262	**	434	0,009	
Pgi-2	403	0,401	**	382	0,341	**	431	0,250	**
Mdh-1	410	-0,100	*	386	0,066	**	436	-0,098	**
Mdh-2	410	0,107	**	385	0,167	**	435	-0,064	**
Prx-1	410	0,199	**	385	0,196	**	435	0,271	*
Prx-2	406	0,476	**	385	0,345	**	435	0,343	**
Prx-3	405	0,512	**	380	0,427	**	419	0,559	**
6Pgdh-1	399	0,104	**	379	0,299	**	436	0,218	**
Skdh-1	405	0,328	**	363	0,283	**	434	0,273	**
G6pdh-1	404	0,027	**	363	0,160	**	430	-0,069	*
Idh-1	398	0,295	**	360	0,240	**	432	0,392	**
IC - Sup. ¹		0,345			0,302			0,325	
Média		0,249	**		0,242	**		0,220	**
IC - Inf.		0,134			0,176			0,110	

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. 1: Intervalo de confiança a 95% de probabilidade, estimado a partir de 10.000 *bootstraps*.

DISCUSSÕES

A alta taxa de cruzamento multilocos detectada para as três populações mostrou que a espécie é de reprodução mista predominantemente alógama. No entanto, acredita-se que estas estimativas possam estar superestimadas, devido à grande probabilidade de ter ocorrido seleção contra indivíduos de autofecundação e de cruzamentos entre aparentados, entre o evento reprodutivo (1981), que deu origem às progênes e o momento da amostragem (1999). Considerando tratar-se de uma espécie predominantemente de cruzamento, portanto, pode conter uma certa taxa de carga genética (Sorensen e White, 1988), é possível que muitas sementes constituídas de genótipos em homozigose para genes letais ou deletérios tenham sido eliminadas por aborto antes da germinação ou morrido durante a fase de viveiro, levando a subestimativas na taxa de autofecundação. Ainda, é possível que a causa da alta mortalidade nos ensaios (20,9 % em Pederneiras e 14,3 % em Luiz Antonio) tenha em parte, esta mesma origem, ou seja, a depressão por endogamia. Estudos sobre a depressão por endogamia em essências florestais têm mostrado altas taxas de depressão por endogamia, atuando antes e após a germinação das sementes. Em alguns estudos também foi observado que a depressão por endogamia pode variar entre populações de uma mesma espécie (Kärkkäinen et al., 1996), além de sua herança poder ter diferentes origens, indo desde a expressão de genes deletérios (letais e deletérios) a efeitos gênicos de dominância (dominância parcial, total e sobredominância) (Charlesworth e Charlesworth, 1987; Mitton et al., 1989; Crow, 1993; Lande et al., 1994; Koelewijn, 1998; Koelewijn et al. 1999).

Dessa forma, a mortalidade não aleatória de sementes de autofecundação e de cruzamentos entre aparentados poderia ter resultado em superestimativas na taxa de cruzamento. Outra hipótese que explicaria as altas taxas de cruzamento, poderia ser a presença de mecanismos

de auto-incompatibilidade na espécie. Estudos de Murawski (1995), têm mostrado que 90,9 % das espécies arbóreas tropicais que ocorrem no extrato superior do dossel, 75,0 % das espécies do extrato intermediário e 34,2% das espécies de sub-bosque, apresentam algum mecanismo de auto-incompatibilidade. Ainda, de acordo com Bawa et al. (1985), a maioria das espécies tropicais, hermafroditas, como *C. legalis*, e de baixas altitudes apresentam fortes barreiras para autofecundação. É importante ressaltar que estas barreiras para a autofecundação não ocorrem obrigatoriamente em todos os indivíduos e durante todo o período de florescimento, podendo ter origem genética e ocorrer apenas em fases específicas do florescimento, portanto, a sua presença não é 100 % efetiva. Assim, a maior parte da autofecundação detectada nas análises individuais das progênes (Tabela 4) poderia ser, na verdade cruzamentos entre aparentados, dado que o modelo utilizado para caracterizar a taxa de cruzamento, modelo de reprodução mista, não separa a autofecundação de cruzamentos entre aparentados nas análises da taxa de cruzamento individuais por planta materna, ou, pode ter origem em erros de amostragem. Entretanto, estas hipóteses não podem ser confirmadas neste trabalho, dado que não foi realizado nenhum acompanhamento da fenologia do florescimento, germinação e desenvolvimento das plantas na fase de viveiro.

Apesar das elevadas taxas de cruzamento detectadas nas populações, o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o teste de homogeneidade nas frequências alélicas dos óvulos e do pólen mostraram desvios de cruzamentos aleatórios, além da t_p ter detectado cruzamentos entre aparentados (mínimo 5,9%). Os desvios de cruzamentos aleatórios foram causados, segundo os locos submetidos ao teste de EEW, pelo sistema reprodutivo, mais especificamente ao cruzamento entre indivíduos aparentados combinado com cruzamentos pre-

ferenciais. Corroborando com esta hipótese, a estimativa da correlação de $\rho(\hat{t}_p)$ ou a probabilidade de detectar-se irmãos completos dentro das progênies, foi expressiva ($> 0,212$), e a heterogeneidade entre o conjunto gênico materno e paterno indica que o pólen não foi homogêneo para o cruzamento individual das árvores maternas, confirmando a hipótese de cruzamentos preferenciais nas populações. Logo, as progênies de polinização aberta não são compostas exclusivamente por meios irmãos, como era esperado se as populações fossem infinitamente grandes e os cruzamentos aleatórios (populações panmíticas), mas também por irmãos completos e plantas de autofecundação. Desvios da pressuposição de panmixia, em testes de progênies de polinização aberta, podem gerar superestimativas na variância genética aditiva (Namkoong, 1966; Squillace, 1974; Surlis et al., 1990), pela sua distribuição incorreta entre e dentro de progênies, do esperado para o modelo exclusivo de meios irmãos ($\frac{1}{4}\hat{\sigma}_A^2$ entre e $\frac{3}{4}\hat{\sigma}_A^2$ dentro de progênies), inflando as estimativas de parâmetros dependentes deste componente, como as herdabilidades e, portanto, também dos ganhos esperados na seleção (Gs). Por sua vez, a presença de cruzamentos entre aparentados diminui a variância aditiva entre progênies e aumenta a variância aditiva dentro de progênies, ou seja aumenta a covariância genética entre indivíduos dentro de progênies.

A taxa de cruzamento entre aparentados (\hat{t}_p), apesar de baixa (máximo 9,1%), foi significativa, sugerindo que esta forma de reprodução gera um certo nível de endogamia nas populações a cada evento reprodutivo e que existe parentesco nas populações naturais. O cruzamento entre aparentados aumenta a quantidade de homocigotos nas populações, apesar de ser uma forma menos drástica de produzir endogamia, do que a autofecundação efetiva, mas não exclui a possibilidade de gerar depressão por endogamia, pela expressão de genes recessivos deletérios (Crow e Kimura, 1970; Ellstrand e Elam, 1993). O maior proble-

ma desta forma de reprodução encontra-se na conservação *in situ* de populações pequenas (< 100 indivíduos) e fragmentadas, como é o caso da população Ibicatu, com 16 indivíduos e Jequitibás com 17 indivíduos. Nestas, o tamanho efetivo já está abaixo do mínimo aceitável para a conservação *in situ* ($\hat{N}_e = 50$), o que pode levá-las a perderem alelos raros (frequência menor que 5%) por deriva genética, em poucas gerações (Frankel e Soulé, 1981). O quadro agrava-se quando se considera que foram detectados cruzamentos entre indivíduos aparentados dentro das populações, como já discutido, portanto, o tamanho efetivo real deve ser ainda menor do que o número de exemplares (Ibicatu 16 e Jequitibás 17). A estratégia de conservação, neste caso, deve ser a do manejo de reposição, aumentando o tamanho destas populações para pelo menos 100 indivíduos. A reposição deve ser feita através da coleta de sementes de outras populações, como por exemplo, da população Vassununga, a qual apresenta aproximadamente 300 indivíduos adultos reprodutivos. O aumento do tamanho populacional poderá melhorar outros aspectos do sistema de reprodução da espécie, como reduzir os cruzamentos preferenciais e a autofecundação e aumentar a aleatoriedade dos cruzamentos, pela alteração no comportamento dos polinizadores, como sugerido por Murawski (1995).

Levando em conta a amostragem de sementes em todas as plantas na população de Piracicaba e Jequitibás e do número de indivíduos representando cada planta materna no ensaio (entre 30 a 60 plantas, considerando os dois ensaios), acredita-se que o conjunto gênico destas populações estejam preservadas nos ensaios de conservação *ex situ*.

A constatação de que os ensaios são compostos em grande parte por plantas advindas de cruzamentos, pressupõe-se que estes apresentem um alto potencial para o melhoramento genético. A seleção dos melhores indivíduos/progênies/populações, permitiria transformar os

ensaios em pomares de sementes do tipo multi-populações e em uma população base de recombinação para um programa de melhoria com a espécie. A recombinação das plantas selecionadas de diferentes populações nos ensaios (total de 55 progênies), pode ampliar a base genética das populações originais, dando origem a uma nova população, com tamanho efetivo que permita submeter a *C. legalis* a um programa de seleção. Contudo, os resultados mostraram que a seleção para produtividade não pode ser baseada nos modelos clássicos de

genética quantitativa aplicados para espécie exclusivamente alógamas, os quais pressupõem cruzamentos aleatórios, ausência de endogamia e parentesco na geração parental ($f = \hat{\theta} = 0$) e progênies compostas exclusivamente por meios irmãos, caso contrário, as estimativas de ganhos genéticos ficarão superestimadas. Para tanto, deve-se optar por modelos que considerem o sistema misto de reprodução, como por exemplo, o modelo sugerido por Cockerham e Weir (1984) e Ritland (1981), para estas situações.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. A *C. legalis* é de reprodução mista, predominantemente alógama;

2. O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, de homogeneidade nas frequências do conjunto gênico do pólen e dos óvulos e a correlação de p (\hat{r}_p) revelaram que os cruzamentos nas populações naturais de *C. legalis* não são obrigatoriamente aleatórios, gerando uma pequena quantidade de indivíduos por cruzamentos entre aparentados e preferenciais;

3. A correlação de t (\hat{r}_s) revelou que os indivíduos de autofecundação encontram-se aleatoriamente distribuídos dentro das progênies e a correlação de p (\hat{r}_p) indicou a existência de irmãos completos dentro das progênies;

4. A alta taxa de cruzamento nas populações sugere que os ensaios apresentem potencial para a conservação *ex situ* e como populações base de recombinação, para o início de um programa de melhoramento com a *C. legalis*.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

ALEXANDRE MAGNO SEBBENN é Pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo. Caixa Postal 1322 – 010590970 - São Paulo, SP. E-mail: amsebben@carpa.ciagri.usp.br

PAULO YOSHIO KAGEYAMA é Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba, SP. E-mail: kageyama@carpa.ciagri.usp.br

ANA CRISTINA MACHADO DE FRANCO SIQUEIRA é Pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo. Estação Experimental de Bauru. Caixa Postal 372 - 17001-970 - Bauru, SP.

ANTONIO CARLOS SCATENA ZANATTO é Pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo

- Caixa Postal 1322 - 01059-970 - São Paulo, SP.

Os autores agradecem à técnica de laboratório Elza Martins Ferraz e aos estagiários Fernanda Gosser Brasso e Gabriel Bortoleto Bichuette pelo auxílio nas eletroforeses de isoenzimas; ao técnico em agropecuária Gelson Dias Fernandes, ao estudante de engenharia florestal Marcio Fedelle (ESALQ/USP) e ao estudante de Biologia Fernando Schmith (UNIMEP) pelo auxílio nos trabalhos de campo. Também agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de doutoramento ao primeiro autor e a FAPESP pelo financiamento do projeto (n.1998/2448-7).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, S.A. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees: 1- sexual systems and incompatibility mechanisms. **American journal of botany**, v.72, n.3, p.331-345, 1985.
- BROWN, A.H.D. Genetic characterization of plant mating systems. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1989. p.145-162.
- BURGESS, I.P.; WILLIAMS, E.R.; BELL, J.C.; HARWOOD, C.E.; OWEN, J.V. The effect of outcrossing rate on the growth of selected families of *Eucalyptus grandis*. **Silvae genetica**, v.45, p.2-3, 1995.
- BUSH, R.M.; SMOUSE, P.E. The impact of electrophoretic genotype on life history traits in *Pinus taeda*. **Evolution**, v.45, n.3, p.481-498, 1991.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Brasília: EMBRAPA/CNPF, 1994. 640p.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual review on ecological systematics**, v.18, p.237-268, 1987.
- CLAYTON, J.; TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of fisheries research board Canadian**, v.29, p. 1169-1172, 1972.
- CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v.30, n.12, p.814-818, 1980.
- COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Covariances of relatives stemming a population undergoing mixed self and random mating. **Biometrics**, v.40, p.157-164, 1984.
- CROW, J.F. Mutation, mean fitness and genetic load. **Oxford survey on evolution biology**, v. 9, p.3-42, 1993.
- CROW, J.F.; KIMURA, M.A. **An introduction to population genetics theory**. New York: Harper and Row, 1970. 591p.
- EL-KASSABY, A.; PARKINSON, J.; DEVITT, W. J.B. The effect of crown segment on the mating system in a Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) seed orchard. **Silvae genetica**, v.35, n.4, p.149-155, 1986a.
- EL-KASSABY, A.; RITLAND, K. FASHLER, A.M.K.; DEVITT, W.J.B. The role of reproductive phenology upon the mating system of a Douglas-Fir seed orchard. **Silvae genetica**, v.37, n.2, p.76-82, 1986b.
- ELLSTRAND, N.; ELAM, D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual review on ecological systems**, v.24, p.217-242, 1993.
- FAO. **Ninth session of the panel of experts on forest gene resources**. Roma, 1996. 64p.
- FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.
- FRIEDMAN, S.T.; ADAMS, W.T. Leaves outcrossing in two Loblolly Pine seed orchards. **Silvae genetica**, v.34, p.157-161, 1985.
- KÄRKKÄINEN, K.; KOSKI, V.; SAVOLAINEN, O. Geographical variation in the inbreeding depression of scots pine. **Evolution**, v.50, n.1, p.111-119, 1996.
- KOELEWIJN, H.P. Effects of different levels of inbreeding on progeny fitness in *Plantago coronopus*. **Evolution**, v.52, n.3, p.692-702, 1998.
- KOELEWIJN, H.P.; KOSKI, V.; SAVOLAINEN, O. Magnitude and timing of inbreeding depression in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). **Evolution**, v.53, n.3, p.758-768, 1999.
- LANDE, R.; SCHEMESKE, D.W.; SCHULTZ, S.T. High inbreeding depression, selective interference among loci, and the threshold selfing rate for purging recessive lethal mutations. **Evolution**, v.48, n.4, p.965-978, 1994.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D.G.D.A. **Genetic date analysis: version 1.0 (d 12) for windows**. Albuquerque: University of New Mexico, 1999.
- LI, C.C.; HORVITZ, D.G. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. **American journal of human genetics**, v.5, p.107-117, 1953.
- MITTON, J.B. et al. Physiological and demographic variation associated with allozyme variation. In: MITTON, J.B. **Isozymes in plant biology**. London, Chapman and Hall, 1989. p.127-145
- MUONA, O; YAZDANI, R.; RUDIN, D. Genetic change between life stages in *Pinus sylvestris*: allozyme variation in seeds and planted seedlings. **Silvae genetica**, v.36, n.1, p.39-41, 1987.

- MURAWSKI, D.A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In: LOWMAN, M.D.; NADKARNI, N.M., ed. **Forest canopies**. New York: Academic Press, 1995. p.457-493.
- MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forest. **Biotropica**, v.26, n.1, p.23-29, 1994.
- NAMKOONG, G. Inbreed effects on estimation of genetic additive variance. **Forest science**, v.12, p.8-13, 1966.
- RESENDE, M.D.V.; HIGA, A.R. Maximização da eficiência de seleção em testes de progênies de *Eucalyptus* através da utilização de todos os efeitos do modelo matemático. **Boletim de pesquisa florestal**, n.28/29, p.11-36, 1994.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR: version 1.1**. Toronto: University of Toronto, 1997. (não publicado).
- RITLAND, K. Series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of heredity**, v.81, p.235-237, 1990.
- RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y.A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical applied genetics**, v.71, p.375-384, 1985.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.
- SEBBENN, A.M.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; KAGEYAMA, P.Y.; MACHADO, J.A.R. Parâmetros genéticos na conservação de cabreúva - *Myroxylon peruiferum* L. F. Allemão. **Scientia forestalis**, n.53, p.31-38, 1998.
- SEBBENN, A.M.; SIQUEIRA, A.C.M.F. VENCOVSKY, R.; MACHADO, J.A.R. Interação genótipo ambiente na conservação *ex situ* de *Peltophorum dubium*, em duas regiões do Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v.11, n.1, p.75-89, 1999.
- SIQUEIRA, A.C.M.F.; NOGUEIRA, J.C.B.; KAGEYAMA, P.Y. Conservação de recursos genéticos *ex situ* de cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) - Leguminosae. **Revista do Instituto Florestal**, v.5, p.2, p.231-243, 1993.
- SIQUEIRA, A.C.M.F.; NOGUEIRA, J.C.B.; ZANATTO, A.C.; MARIANO, G.; CRUZ, I.I. O jequitibá rosa - *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze: uma espécie em extinção. **Boletim técnico do Instituto Florestal**, 40A, p.291-301, 1986.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLE, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of griding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American fern journal**, v.73, n.1, p.9-26, 1983.
- SORENSEN, F.C.; WHITE, T.L. Effect of natural inbreeding on variance structure in tests of wind-pollination Douglas-Fir progenies. **Forest science**, v.34, n.1, p.102-118, 1988.
- SQUILLACE, A.E. Average genetic correlations among offspring from open-pollinated forest trees. **Silvae genetica**, v.23, p.149-156, 1974.
- SURLES, S.E.; ARNOLD, J.; SCHNABEL, A.; HAMRICK, J.L.; BONGARTEN, B.C. Genetic relatedness in open-pollinated families of two leguminous tree species, *Robinia pseudoacacia* L. and *Gleditsia triacanthos* L. **Theoretical applied genetics**, v.80, p.49-56, 1990.
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. Biosys-1: a FORTRAN computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. **Journal of heredity**, v.72, p.282-283, 1989.
- VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Revista brasileira de genética**, v.17, n.3, p.349-351, 1994.
- WANG, C.H.T.; LIN, T.P. Inheritance and linkage relationship of allozymes, and estimation of outcrossing rates in a seed orchard of *Cunninghamia konishii* Hay. **Silvae genetica**, v.47, p.33-37, 1998.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: 2- methods for discrete population genetic data**. Sunderland: North Caroline State University / Sinauer Associates, 1996. 445p.
- WORKMAN, P.; NISWANDER, J.L. Population studies on southwestern Indian tribes: 2- local genetic differentiation in the Papago. **American journal human genetic**, v.22, p.24-49, 1970.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420, 1965.