SISTEMA DE REPRODUÇÃO EM POPULAÇÕES DE *Esenbeckia leiocarpa* Engl.[1]

Carlos Eduardo Sícoli SEOANE[2]
Alexandre Magno SEBBENN[3]
Paulo Yoshio KAGEYAMA[4]

RESUMO

O sistema de reprodução de duas populações naturais de *Esenbeckia leiocarpa* (guarantã) foi estudado em dois fragmentos florestais do Estado de São Paulo, a partir da análise de eletroforese de isoenzimas. A análise da taxa de cruzamento mostrou a espécie como alógama, porém o teste de homogeneidade nas freqüências do conjunto gênico do pólen e dos óvulos e a correlação de paternidade ($\hat{r}_p$) revelaram que os cruzamentos nas populações naturais de *E. leiocarpa* não foram aleatórios, gerando uma pequena quantidade de indivíduos por cruzamentos entre aparentados e preferenciais. A correlação da taxa de autofecundação ($\hat{r}_s$) revelou que os indivíduos de autofecundação encontram-se aleatoriamente distribuídos dentro das progênies e a correlação de paternidade ($\hat{r}_p$) indicou a existência de uma alta proporção de irmãos completos dentro das progênies de polinização livre. Por sua vez, comparando os parâmetros do sistema de reprodução entre os fragmentos, verificou-se a ausência de diferenças entre o maior (Caetetus) e o menor (Ibicatu) fragmento.

Palavras-chave: sistema de reprodução; *Esenbeckia leiocarpa*; eletroforese de isoezimas, genética de populações; fragmentação florestal.

ABSTRACT

The mating system of two natural populations of *Esenbeckia leiocarpa* (guarantã) was studied in two forests fragments in São Paulo State, by isoenzymes. The mating system showed that the species is alogamous, but the homogeneity of pollen and ovules alelle frequencies and the paternity correlation ($\hat{r}_p$) showed that outcrossing in natural populations of *E. leiocarpa* was not random, generating a small number of individuals by outcrossing among relatives and preferentials. The sefing correlation ($\hat{r}_s$) demonstrated that self-fertilization individuals are found randomly distributed within progenies and the paternity correlation ($\hat{r}_p$) indicated the existence of high proportions of full-sibs within outcrossing progenies. In comparing the mating system parameters between fragments, differences were not observed between the larger (Caetetus) and smaller (Ibicatu) fragments.

Key words: mating system; *Esenbeckia leiocarpa*; electrophoresis isozymes; population genetics; forest fragmentation.

1 INTRODUÇÃO

Estudos da estrutura genética das populações naturais buscam descrever os níveis e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. Esta distribuição é decorrente do sistema de reprodução, da forma de cruzamento e da síndrome de dispersão de pólen e sementes. Tais fatores permitem explicar o comportamento dos alelos nas populações (Wright, 1943).

A fragmentação florestal, além de isolar reprodutivamente indivíduos que contêm apenas uma pequena amostra do conjunto gênico da população original (gargalo genético), pode causar contínua perda de alelos por deriva genética, caso a população remanescente permaneça isolada por várias gerações (Hamrick, 1989). As predições teóricas indicam que quando se tem poucas gerações, os resultados observados se devem ao efeito de gargalo genético (Young *et al.*, 1996) e quanto menor for o remanescente populacional, maior será a perda da variabilidade genética.

A curto prazo, a perda de variabilidade genética pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional. A longo prazo, a redução da riqueza alélica deve limitar a habilidade das espécies a responderem às mudanças devidas à ação de forças seletivas (Ellstrand & Ellan, 1993).

(1) Aceito para publicação em março de 2001.
(2) R. Carlos de Campos, 271, Alemães, 13418-240, Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: amsebben@carpa.ciagri.usp.br
(3) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01050-970, São Paulo, SP, Brasil.
(4) ESALQ/USP, Av. Pádua Dias,11, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: kageyama@carpa.ciagri.usp.br

E. leiocarpa, ou guarantã, é espécie da família Rutaceae, semidecídua e esciófita, característica da floresta latifoliada primária, onde apresenta distribuição espacial agregada, na forma de reboleiras, consideradas neste trabalho como subpopulações, que podem se estender por centenas de metros. A polinização é miofílica, com fecundação cruzada obrigatória (Crestana *et al.*, 1982). O fruto é autocórico, podendo ser lançado até cinco metros de distância da planta mãe. As sementes são uma recompensa em potencial para dispersores. Como a miofilia e a autocoria são pouco eficientes em termos de distância de dispersão, os indivíduos dentro das subpopulações, provavelmente apresentam um maior grau de parentesco entre si do que indivíduos de diferentes subpopulações, ou seja, as subpopulações devem consistir de estruturas de famílias. Assim sendo, importante fração da variabilidade genética das populações seria dada pelo grande número de subpopulações que constituem a população em ambientes naturais ou em fragmentos maiores. Contudo, em fragmentos de tamanho reduzido, o fluxo gênico ficará restrito entre as subpopulações remanescentes, o que poderá acarretar em erosão genética por efeito de deriva genética, a longo prazo.

A deriva genética acarreta em endogamia, podendo ser detectada na análise do sistema de reprodução, pelos cruzamentos entre aparentados. Considerando ainda, que o sistema de cruzamento determina como os genes são transmitidos de uma geração para outra e como estes são organizado nos indivíduos, ele tem um papel fundamental na determinação da estrutura genética das populações, juntamente com os mecanismos de dispersão de pólen e sementes (Hamrick & Loveless, 1986; Hamrick & Schnabel, 1985).

Este estudo objetivou estimar o sistema de cruzamento de duas populações de *E. leiocarpa* em dois fragmentos de diferentes tamanhos, a fim de verificar os efeitos da fragmentação sobre o sistema de reprodução da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em dois fragmentos de Floresta Mesófila Semidecídua, Caetetus e Ibicatu: Estação Ecológica de Caetetus, que ocupa uma área de 2.178 hectares e localiza-se entre as Latitudes 22°22' e 22°27'S e Longitudes de 49°40' a 49°43'W, entre os municípios de Gália e Alvinlândia-SP; Estação Ecológica de Ibicatu, que ocupa uma área de 76 hectares, e localiza-se entre as Latitudes 22°47' e 22°48' S e Longitudes de 47°49' a 47°50'W, no município de Piracicaba-SP. Ambas as estações são patrimônios do Instituto Florestal de São Paulo. A distância entre os dois fragmentos é de aproximadamente 250 km. A espécie apresenta distribuição agregada em reboleiras compostas por até 100 plantas. Para a caracterização do sistema de reprodução foram coletadas sementes de 10 matrizes de cada população. Também foram amostrados 20 indivíduos adultos em duas subpopulações de cada fragmento, totalizando 40 indivíduos por população, a fim de comparar-se os níveis de endogamia entre a geração adulta que deu origem às sementes e a geração das sementes. As sementes foram germinadas e 20 plantas de cada matriz (progênies) foram genotipadas para seis sistemas isoenzimáticos. A eletroforese de isoenzimas foi realizada no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA/ESALQ/USP), em Piracicaba, SP, com tecidos foliares segundo a metodologia proposta por Kephart (1990) e Alfenas (1998). A eletroforese foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%. O tampão de cuba e gel utilizado foi o Citrato Morfolina (CM, pH 6.1 - Clayton & Tretiak, 1972). As enzimas foram extraídas de tecidos foliares, 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: Alfa-Esterase (α-EST-E.C. 3.1.1.1), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH-E.C. 1.1.1.44), Fosfoglucose Isomerase (PGI-E.C. 5.3.1.9), Malato Desidrogenase (MDH-E.C. 1.1.1.37), Peroxidase (PRX-E.C. 1.11.1.7) e Xiquimato Desidrogenase (SKDH-E.C. 1.1.1.25). As receitas de revelação das isoenzimas encontram-se em Alfenas (1998).

A partir dos genótipos individuais estimou-se as freqüências alélicas que por sua vez permitiram os cálculos dos índices de diversidade genética como: heterozigosidade média observada ($\hat{H}_o$), heterozigosidade média esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\hat{H}_e$) e índice de fixação de Wright ($\hat{f}$). Estes índices foram obtidos a partir do programa BIOSYS1 de Swofford & Selander (1989).

O sistema de reprodução das populações de *E. leiocarpa* foi analisado com base no modelo de cruzamento misto de Ritland & Jain (1981), com o auxílio do programa "Multilocos MLTR" de Ritland (1997). Foi estimado: 1) a taxa de cruzamento multilocos da população ($\hat{t}_m$), pelo método de máxima verossimilhança (Expectation-Maximization - EM); 2) a taxa de cruzamento média unilocos da população ($\hat{t}_s$); 3) a taxa de cruzamento entre aparentados ($\hat{t}_p = \hat{t}_m - \hat{t}_s$); 4) as freqüências alélicas dos óvulos e do pólen (*o* e *p*), também pelo método de máxima verossimilhança; 5) a correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$), e 6) a correlação de cruzamento paterno ($\hat{r}_p$). 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 & Jain, 1981; Ritland, 1990; Ritland, 1997). 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*, utilizou-se o procedimento de reamostragem do tipo *bootstrap*, com 1000 reamostragens, onde as unidades de amostragem foram as plantas dentro das progênies. O teste de cruzamentos aleatórios foi realizado pelo teste de homogeneidade das freqüências alélicas dos óvulos e do pólen, pela estimativa $\hat{F}_{ST}$ (Wright, 1965), utilizando-a apenas como uma medida de divergência genética entre freqüências alélicas de grupos distintos. 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 & Niswander (1970), onde: n = número de gametas nos dois grupos (pólen e óvulos), k = número de alelos e s = número de grupos (2 - pólen e óvulo). O índice de fixação em nível de progênies ($\hat{f}$) e de indivíduos adultos ($\hat{f}_p$) foi obtido por análise de variância das freqüências gênicas para cada população e seus respectivos intervalos de confiança por 10.000 reamostragens *bootstrap*, estimativas obtidas pelo programa GDA (Lewis & Zaykin, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$) foi alta (> 0,925) nas duas populações, indicando que a espécie é de reprodução mista, predominantemente alógama (TABELA 1). Contudo, considerando o intervalo de confiança da estimativa de $\hat{t}_m$ verifica-se que estas estimativas não são diferentes de 1,0, logo existe 50% de probabilidade da espécie ser totalmente alógama. Crestana *et al.* (1982) estudaram o sistema de reprodução de *E. leiocarpa* por polinização controlada, concluindo que a espécie é alógama e auto-incompatível. A taxa de cruzamento média inferior a 1,0 e a probabilidade de 50% deste valor ser ainda menor que a média estimada, pode ser erro de amostragem. Uma das maiores fontes de erros nas estimativas da taxa de cruzamento, pelo modelo misto de reprodução de Ritland & Jain (1981) é a violação da pressuposição de homogeneidade nas freqüências alélicas dos óvulos e do pólen. Na TABELA 2, observa-se que dos sete locos avaliados no fragmento Caetetus, dois apresentaram desvios do modelo de homogeneidade nas freqüências alélicas dos óvulos e do pólen e no fragmento Ibicatu três dos seis locos. Este resultado pode ter contribuído para erros nas estimativas da taxa de cruzamento. Ainda, a falta de homogeneidade indica que os cruzamentos não foram aleatórios, tendo ocorrido também cruzamentos preferenciais.

TABELA 1 - Taxa de cruzamento multilocos da planta materna ($\hat{t}$), parâmetros do sistema de reprodução e índices de diversidade genética nas populações de *E. leiocarpa* em dois fragmentos (Caetetus e Ibicatu).

	Caetetus	Ibicatu
Progênie 1 ($\hat{t}$)	1,00 (0,00)	0,72 (0,30)
Progênie 2 ($\hat{t}$)	0,90 (0,11)	1,00 (0,00)
Progênie 3 ($\hat{t}$)	1,00 (0,00)	0,60 (0,14)
Progênie 4 ($\hat{t}$)	1,00 (0,00)	0,51 (0,16)
Progênie 5 ($\hat{t}$)	0,99 (0,01)	1,00 (0,01)
Progênie 6 ($\hat{t}$)	0,92 (0,20)	0,95 (0,10)
Progênie 7 ($\hat{t}$)	0,29 (0,13)	1,00 (0,00)
Progênie 8 ($\hat{t}$)	0,98 (0,11)	1,00 (0,00)
Progênie 9 ($\hat{t}$)	1,00 (0,00)	0,76 (0,18)
Progênie 10 ($\hat{t}$)	0,39 (0,12)	0,74 (0,15)
Taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$)	0,925 (0,081)	0,997 (0,017)
Taxa de cruzamento unilocos ($\hat{t}_s$)	0,859 (0,065)	0,937 (0,020)
Taxa de cruz. entre aparentados ($\hat{t}_p = \hat{t}_m - \hat{t}_s$)	0,066 (0,032)	0,061 (0,018)
Correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$)	0,099 (0,033)	0,104 (0,004)
Correlação de paternidade ($\hat{r}_p$)	0,986 (0,037)	0,749 (0,080)
Heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$)	0,183 (0,075)	0,168 (0,084)
Heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$)	0,168 (0,072)	0,172 (0,079)
Índice de fixação nas progênies ($\hat{f}$)	-0,068 [-0,243 a 0,245]	-0,001 [-0,091 a 0,091]
Índice de fixação nos adultos ($\hat{f}_p$)	-0,187 [-0,367 a 0,246]	-0,040 [-0,095 a 0,199]

( ): erro padrão da média; [ ]: intervalo de confiança, obtido por 10.000 reamostragens *bootstrap*.

TABELA 2 - Divergência genética entre freqüências alélicas dos óvulos e do pólen ($\hat{F}_{ST}$) e teste de qui-quadrado (χ^2) em duas populações de *E. leiocarpa*.

		Pop. Caetetus				Pop. Ibicatu			
Loco	Al.	Pólen	Óvulo	$\hat{F}_{ST}$	χ^2	Pólen	Óvulo	$\hat{F}_{ST}$	χ^2
6Pgd1	1	---	---		---	0,982 (0,012)	0,952 (0,002)		[1]
	2	---	---	---	---	0,018 (0,012)	0,048 (0,002)	0,007	1,41
Skdh 1	1	0,995 (0,003)	0,952 (0,002)		[1]	---	---		---
	2	0,005 (0,003)	0,048 (0,002)	0,018	3,58*	---	---	---	---
Mdh 1	1	0,994 (0,004)	0,950 (0,034)		[1]	---	---		---
	2	0,006 (0,004)	0,050 (0,034)	0,018	2,19	---	---	---	---
Mdh 3	1	0,950 (0,019)	0,950 (0,031)		[1]	0,720 (0,078)	0,619 (0,072)		
	2	0,050 (0,019)	0,050 (0,031)	0,0	0,0	0,245 (0,085)	0,333 (0,072)		[2]
	3	---	---			0,034 (0,027)	0,048 (0,002)	0,010	3,65
Mdh 4	1	0,967 (0,011)	0,850 (0,058)			0,942 (0,023)	0,810 (0,063)		
	2	0,027 (0,011)	0,050 (0,030)		[2]	0,039 (0,018)	0,143 (0,065)		[2]
	3	0,005 (0,000)	0,100 (0,055)	0,034	12,38**	0,019 (0,009)	0,048 (0,002)	0,033	12,22**
Pgi 1	1	0,702 (0,045)	0,700 (0,072)		[1]	0,815 (0,097)	0,600 (0,089)		[1]
	2	0,298 (0,045)	0,300 (0,072)	0,0	0,0	0,185 (0,097)	0,400 (0,089)	0,056	9,10**
Est 1	1	0,465 (0,112)	0,350 (0,073)			0,184 (0,069)	0,048 (0,033)		
	2	0,250 (0,079)	0,250 (0,104)		[2]	0,564 (0,097)	0,524 (0,052)		
	3	0,285 (0,070)	0,400 (0,100)	0,010	3,80	0,238 (0,082)	0,381 (0,063)		[3]
	4	---	---			0,014 (0,008)	0,048 (0,002)	0,016	6,34
Prx 1	1	0,179 (0,046)	0,190 (0,071)			0,646 (0,165)	0,700 (0,096)		
	2	0,342 (0,059)	0,333 (0,085)			0,158 (0,067)	0,250 (0,082)		[2]
	3	0,474 (0,072)	0,429 (0,043)		[3]	0,196 (0,128)	0,050 (0,029)	0,017	6,27*
	4	0,006 (0,003)	0,048 (0,002)	0,002	0,57	---	---		

( ): erro padrão da média; [ ] graus de liberdade; ** e *: significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente.

Vale ressaltar, ainda, que a auto-incompatibilidade é um mecanismo que atua em diferentes etapas do processo de florescimento das plantas, podendo existir fases em que a autofecundação seja possível. Esta poderia ser uma das explicações para os resultados observados. De qualquer forma, a estimativa de $\hat{t}_m$ foi alta (mínimo de 0,925), sugerindo que a espécie apresenta populações com altos níveis de heterozigose, fato confirmado pelas altas estimativas da heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$) e esperada ($\hat{H}_e$). As heterozigosidades foram no mínimo 0,168, valor similar ao estimado para espécies polinizadas por animais (0,167) e superior a espécies de dispersão das sementes do tipo explosiva (0,097) e arbóreas tropicais (0,142), segundo estudos de Hamrick & Godt (1989).

Entretanto, apesar das altas taxas de cruzamentos obtidas, a taxa de cruzamento unilocos ($\hat{t}_s$) foi inferior à taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$), demonstrando que ocorreram cruzamentos entre aparentados, $\hat{t}_p$ (Shaw & Allard, 1982; Ritland & El-Kassaby, 1985; Ritland, 1990). Ambas as populações apresentaram aproximadamente 6% de cruzamentos entre aparentados, sendo estas estimativas significativas, de acordo com seus intervalos de confiança. O cruzamento entre aparentados gera endogamia dentro das populações, apesar de ser menos drástico do que a autofecundação efetiva (Allard, 1971). As estimativas significativas de $\hat{t}_p$ também sugerem que as populações apresentam subpopulações estruturadas em famílias, colaborando para a hipótese de que as espécies que apresentam distribuição agregada, apresentam estrutura genética intrapopulacional. Este resultado é de grande importância para o caso de submeter-se *E. leiocarpa* a programas de melhoramento genético. Em tal situação, o parentesco deve ser considerado nas estimativas dos parâmetros genéticos, caso contrário corre-se o risco de obter-se estimativas errôneas da variância genética aditiva e parâmetros afins (Squillace, 1974; Surles *et al.*, 1990).

As estimativas da correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$) foram baixas (máximo de 0,104), mas significativas, sugerindo que em ambos os fragmentos os indivíduos de autofecundação encontram-se aleatoriamente distribuídos nas progênies, não existindo a tendência de algumas progênies apresentarem mais indivíduos de autofecundação do que outras. Por sua vez, a correlação de paternidade ($\hat{r}_p$) foi alta (mínimo de 0,749) e significativa em ambas as populações, confirmando o resultado anterior revelado pela heterogeneidade entre as freqüências alélicas dos óvulos e do pólen, isto é, ocorreram cruzamentos preferenciais nas populações. Já a magnitude de $\hat{r}_p$ evidencia que as progênies originadas por cruzamentos são compostas em grande parte por irmãos completos, tendo uma menor proporção de meios irmãos. Assim, a partir destes resultados, pode-se esperar que na média das populações, a progênie de uma planta materna seja composta, principalmente, por indivíduos de cruzamento, sendo que estes, por sua vez, são na maioria irmãos completos. Este resultado também deve ser considerado em programas de melhoramento, caso contrário, as estimativas de parâmetros genéticos terão pouco valor na caracterização das populações.

A taxa de cruzamento a nível de plantas maternas variou consideravelmente dentro das populações (TABELA 1). Nas duas populações, seis das dez plantas maternas apresentaram taxas de cruzamento inferior a 1,0, sendo contudo, apenas duas significativamente diferentes de 1,0 na população Caetetus (progênies 7 e 10) e quatro na população Ibicatu (progênies 3, 4, 9 e 10), a julgar pelo erro padrão da média. As taxas inferiores a 1,0 podem ter duas explicações: primeiro, o mecanismo de auto-incompatibilidade não atua durante todo o processo de florescimento ou varia entre plantas, sendo que a autofecundação detectada teria ocorrido durante o período em que este não estava atuando, ou apenas em plantas que não apresentam auto-incompatibilidade; segundo, a taxa de autofecundação detectada, a nível de plantas maternas, seria na verdade cruzamento entre aparentados e como a estimativa multilocos da taxa de cruzamento individual não separa a taxa de autofecundação da taxa de cruzamento entre aparentados, como no caso das estimativas médias populacionais, a taxa de cruzamento entre aparentados teria sido confundida com a taxa de autofecundação. As duas hipóteses são plausíveis e um estudo detalhado da herança e expressão da auto-incompatibilidade pode evidenciar melhor este resultado.

Comparando-se os níveis de fixação de alelos entre a geração de progênies ($\hat{f}$) e a adulta ($\hat{f}_p$), verifica-se que em todos os casos existe um pequeno excesso de heterozigotos, em relação ao modelo de EHW, porém estes índices não foram diferentes de zero, de acordo com o intervalo de confiança, podendo-se assim afirmar que as populações encontram-se em EHW. Todavia, observa-se em ambas as populações que o índice de fixação na geração de adultos (-0,187 e -0,040) tende a conter maior excesso de heterozigotos, relativamente às progênies (-0,068 e -0,001), sugerindo seleção para heterozigotos entre a fase de plântula e a fase adulta. Por sua vez, considerando as isoenzimas como marcador neutro, a seleção para heterozigotos poderia ser atribuída ao efeito de ligação entre locos isoenzimáticos e de efeito adaptativo.

Finalmente, verifica-se que, de modo geral, os resultados não mostraram diferenças marcantes na taxa de cruzamento entre o maior fragmento (Caetetus) e o menor (Ibicatu). A maior diferença detectada foi o dobro do número de plantas maternas com taxa de cruzamento baixa e significativa no fragmento Ibicatu em relação à população Caetetus.

4 CONCLUSÕES

1. A análise da taxa de cruzamento de *E. leiocarpa* mostrou a espécie como alógama.
2. O teste de homogeneidade nas freqüências do conjunto gênico do pólen e dos óvulos e a correlação de paternidade ($\hat{r}_p$) revelaram que os cruzamentos nas populações naturais de *E. leiocarpa* não foram aleatórios, gerando uma pequena quantidade de indivíduos por cruzamentos entre aparentados e preferenciais.
3. A correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$) revelou que os indivíduos de autofecundação encontram-se aleatoriamente distribuídos dentro das progênies e a correlação de paternidade ($\hat{r}_p$) indicou a existência de uma alta proporção de irmãos completos entre indivíduos de cruzamento, dentro das progênies.
4. Não foram detectadas diferenças na taxa de cruzamento entre o maior (Caetetus) e o menor (Ibicatu) fragmento.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Florestal de São Paulo pela permissão para a amostragem na Estação Ecológica de Ibicatu-SP e Estação Ecológica de Caetetus-SP. Os autores também são gratos à FAPESP pelo suporte financeiro ao trabalho e pela concessão da bolsa de mestrado para o primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, S. A. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins:** fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.

CLAYTON, J.; TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal Fisheries Research Board Canadian**, Canada, v. 29, p. 1169-72, 1972.

CRESTANA, C. S. M.; DIAS. I. S.; KAGEYAMA, P. Y. Biologia floral do guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.). In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., 1982, Belo Horizonte. **Anais...** São Paulo: SBS, 1982. (Silvicultura, São Paulo, v. 28, p. 35-38, 1982).

ELLSTRAND, N. C.; ELLAN, D. R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. **Annual Review on Ecological Systematics**, Davis, v. 24, p. 217-242, 1993.

HAMRICK, J. L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. (Ed.). **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations**. London: Chapman and Hall Ltd., 1989. p. 87-105.

_____.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D. *et al.* (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources.** Massachusetts: Sinauer, Sunderland, 1989. p. 43-63.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T. H. (Ed.). **Frugivores and seed dispersal**. New York: Junk Publishers, 1986. cap. 17. 392 p.

_____.; SCHNABEL, A. Understanding the genetic structure of plant populations: some old problems and a new approach. In: GREGORIOUS, H. R. (Ed.). **Lecture notes in biomathematic;** population genetics in forestry. Berlin: Springer Verlag, 1985. p. 50-70.

KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, Oklahoma, v. 77, n. 5, p. 693-712, 1990.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic date analysis**. Versão 1.0 para Windows 3.1. 1999. (Não publicado).

RITLAND, K. Series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, Cary, v. 81, p. 235-237, 1990.

_____. **Multilocus mating system program MLTR:** version 1.1. Canada: University of Toronto, 1997. (Não publicado).

_____.; 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**, Berlin, v. 71, p. 375-384, 1985.

_____.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, Lund, v. 47, p. 35-52, 1981.

SHAW, D. V.; ALLARD, R. W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-Fir using isozyme markers. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 62, p. 113-120, 1982.

SQUILLACE, A. E. Average genetic correlations among offspring from open-pollinated forest trees. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 23, p. 149-156, 1974.

SURLES, S. E. *et al.* Genetic relatedness in open-pollinated families of two leguminous tree species, *Robinia pseudoacacia* L. and *Gleditsia triacanthos* L. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, 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**, Cary, v. 72, p. 282-283, 1989.

WORKMAN, P.; NISWANDER, J.L. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. **American Journal Human Genetic**, Chicago, v. 22, p. 24-49, 1970.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, Washington, v. 28, p. 114-138, 1943.

_____. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, San Francisco, v. 19, p. 395-420, 1965.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, A. H. D. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tree**, Victoria, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.