

CAPÍTULO 20

Polinização efetiva em pomar de *Ilex paraguariensis* St. Hil.

Simone Neumann Wendt

Valderês Aparecida de Sousa

Alexandre Magno Sebbenn

José Alfredo Sturion

Felipe Luís

Marguerite Quoirin

Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. - Aquifoliaceae) é uma espécie arbórea, típica das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, sendo encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina. Desempenha importante papel socioeconômico, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina.

Para atender à crescente demanda de mercado, a implantação de ervais com elevada produtividade, qualidade e rentabilidade é desejável. Porém, a baixa qualidade genética das sementes utilizadas tem sido um fator limitante e a produção ainda é insuficiente (ZANON, 1988; RESENDE; STURION; MENDES, 1995; MACCARI JUNIOR, 2000).

Nesse sentido, a implantação de pomares de sementes são extremamente importantes para o melhoramento da espécie, pois o sucesso de plantios a curto e longo prazo depende da qualidade genética das sementes empregadas. A qualidade genética é influenciada pelo sistema de reprodução, como taxa de autofecundação, contaminação por pólen externo, variações na fenologia de florescimento, variação individual na fertilidade masculina e distância de dispersão de pólen. Sendo assim, estudos

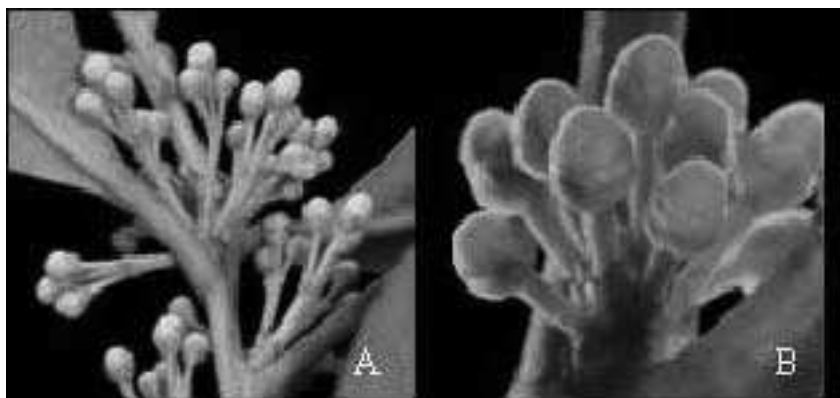
dos padrões de isolamento, reprodução e dispersão de pólen são extremamente importantes para assegurar a qualidade genética das sementes produzidas em pomares de sementes (RITLAND; EL-KASSABY, 1985; WANG, 2004). Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando marcadores bioquímicos (isoenzimas) e moleculares para avaliar a dinâmica reprodutiva de pomares de sementes (XIE; KNOWLES, 1994; PLOMION et al., 2001; COTTRELL; WHITE, 1995; MORIGUCHI et al., 2004; STOEHR; NEWTON, 2002; HANSEN; KJAER, 2006).

O objetivo do nosso trabalho foi estudar os níveis de imigração, a distância de dispersão de pólen e o sistema de reprodução em um pomar de sementes de *I. paraguariensis*.

Metodologia

Características da espécie

I. paraguariensis é uma espécie dióica críptica, com flores díclinas e um dos sexos abortivo (FERREIRA et al., 1983) (Figura 1). O período de floração ocorre de setembro a dezembro (REITZ et al., 1988; SOUSA et al., 2003). A polinização é realizada, principalmente, por insetos (entomófila), podendo ocorrer alguma transferência de pólen pelo vento. A dispersão de sementes ocorre por zoocoria, especialmente por aves (FERREIRA et al., 1983).



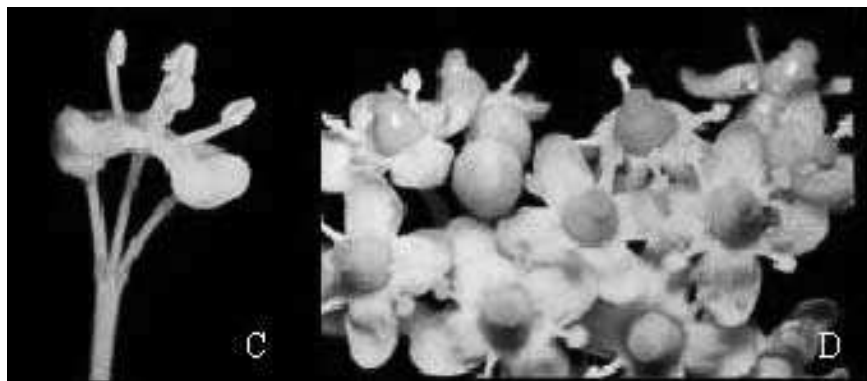


Figura 1. Inflorescências (A - masculinas e B - femininas) e flores (C - masculinas e D - femininas) de *I. paraguariensis* (Fotos cedidas por Valderês A. de Sousa e Tiago L. Daros/*Embrapa Florestas*).

Local de estudo e amostragem

A área de estudo foi um pomar de sementes de *I. paraguariensis*, localizado na *Embrapa Florestas*, em Colombo, Paraná. O pomar é proveniente do desbaste realizado em um teste combinado de procedências e progênies, sendo as árvores selecionadas com base na produção de massa foliar. O mesmo é formado por 82 árvores originadas de três procedências do Estado do Paraná (Toledo, Cascavel e Campo Mourão) e uma do Estado do Rio Grande do Sul (Soledade). Para as análises genéticas, coletaram-se tecidos foliares de 25 árvores matrizes, das suas respectivas progênies (30 indivíduos por matriz) e de todas as árvores masculinas do pomar (45 árvores). Doze árvores femininas não foram analisadas, pois não produziram o número desejado de descendentes. Amostras de folhas jovens foram coletadas das árvores adultas e acondicionadas em geladeira a 5 °C. Os frutos, após a coleta, foram macerados para a separação das sementes. As mesmas foram secas, estratificadas, germinadas e, posteriormente, repicadas para tubetes (36 plântulas de cada matriz).

Extração das enzimas e eletroforese

O tampão de extração utilizado foi adaptado do empregado em *Araucaria angustifolia*, detalhes em (WENDT, 2005). A

separação dos produtos protéicos foi realizada a partir de eletroforese horizontal, tendo como suporte penetrose (13 %) e sacarose (1,35 %). Quatro sistemas isoenzimáticos foram utilizados para as análises: PGI e GOT, no tampão Lítio-borato pH 8,1 e 6-PGDH e G-6PDH, no tampão Tris-citrato pH 7,5. Foram analisados os seguintes locos gênicos: *GOT-A*, *PGI-B*, *6-PGDH-A*, *6-PGDH-B* e *G-6PDH-A*.

Análise dos dados

O isolamento do pomar foi analisado por exclusão de paternidade, utilizando o método de máxima verossimilhança implementado no programa CERVUS 2.0 (MARSHALL et al., 1998). Considerou-se pólen imigrante o pólen que fecundou sementes que não tiveram um parental masculino determinado dentro do pomar. O nível de confiança utilizado foi de 80 %, conforme sugere Marshall et al. (1998). Também considerou-se a possibilidade de 30 % do pólen ser imigrante e taxa zero de erro de tipagem entre o genótipo das plântulas e do possível candidato a pai.

O sistema de reprodução foi analisado com base nos modelos de reprodução misto de Ritland e Jain (1981) e cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989), utilizando o programa "Multilocus MLTR" (RITLAND, 2004). Os parâmetros estimados foram: freqüências alélicas dos óvulo e pólen; índice de fixação nas árvores maternas (F_{mat}); taxa populacional de cruzamento multiloco (t_m); taxa populacional de cruzamento uniloco (t_s); taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($1-t_m$) e correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$). O erro padrão das estimativas dos parâmetros foi obtido por 500 reamostragens *bootstraps*. O número efetivo de árvores polinizadoras (N_{ep}) foi calculado da correlação de paternidade por $\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p$ (RITLAND, 1989). A inferência sobre os cruzamentos aleatórios foi também realizada pelo teste de homogeneidade das freqüências alélicas dos óvulos

e do pólen, usando a estatística F_{ST} (WRIGHT, 1965). A significância estatística do parâmetro para cada loco foi obtida pelo teste de qui-quadrado, proposto por Workman e Niswander (1970): , com , em que n é o número de gametas nos dois grupos (pólen e óvulo); k o número de alelos e s o número de grupos. Esta estatística também foi utilizada para verificar se as frequências alélicas do pólen efetivo divergiam das frequências alélicas das árvores masculinas e se as frequências alélicas das árvores masculinas diferiam das árvores femininas.

Os índices de fixação das árvores adultas (F_a , masculinas mais femininas), árvores masculinas (F_m) e das progênies (F_p) foram calculados a partir da expressão proposta por Weir (1996). Os índices de fixação e seus respectivos intervalos de confiança, obtidos por 10 mil reamonstragens *bootstraps*, foram estimados utilizando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 1999). O parentesco dentro das progênies foi inferido da estimativa do coeficiente médio de coancestria (Θ_{xy}) entre plantas dentro de progênies, usando a expressão proposta por Sousa et al. (2005) para espécies dióicas: $\hat{\Theta}_{xy} = 0,125(1 + \hat{F}_p)(1 + \hat{r}_p)$. Dos coeficientes de coancestria e endogamia das progênies, estimou-se o tamanho efetivo de variância, $\hat{N}_{e(v)} = 0,5 / \left\{ \hat{\Theta}_{xy} \left[\frac{(n-1)}{n} \right] + \left[\frac{(1 + \hat{F}_p)}{2n} \right] \right\}$ (COCKERHAM, 1969), em que n é o número de plantas dentro de progênies.

Seguindo a metodologia proposta por Smouse et al., (2001), realizou-se a análise TWOGENER, usando o genótipo e a localização espacial das árvores matrizes e os genótipos de suas respectivas progênies. O princípio do método é estimar a diferenciação no conjunto gênico do pólen () recebido por diferentes árvores de uma população, usando análise de variância. A contribuição paterna de cada semente é deduzida pela subtração do gameta materno do genótipo diplóide de cada semente, loco por loco. Após, os gametas paternos de diferentes árvores matrizes são submetidos a uma análise de variância molecular (ANOVA), de onde se obtém a medida de diferenciação genética entre o pólen

Φ_{ft}

recebido por diferentes árvores, a partir de uma correlação intraclasse [r_{ij}], derivada dos componentes de variação genética entre a frequência do pólen de diferentes árvores (σ_A^2) e dentro de árvores (σ_W^2). A análise TWOGENER foi conduzida utilizando uma implementação do algoritmo TWOGENER, programado F. Austerlitz (Université Paris-Sud, France). O intervalo de confiança a 95 % de probabilidade do parâmetro Φ_{ft} foi estimado por 1.000 reamostragens *bootstrap* entre progênies. Adicionalmente, Austerlitz e Smouse (2001a) têm mostrado que o parâmetro Φ_{ft} pode ser superestimado se existir endogamia na população parental. Assim, o parâmetro Φ_{ft} foi corrigido para o coeficiente de endogamia na geração parental (F_p) por: $\hat{\Phi}'_{ft} = \hat{\Phi}_{ft} / (1 + \hat{F}_p)$ (AUSTERLITZ; SMOUSE, 2001a). Contudo, como o parâmetro Φ_{ft} é medido apenas em relação ao conjunto de pólen (SMOUSE e SORK, 2004), a correção foi realizada em relação ao coeficiente de endogamia estimado nas árvores paternas (F_p) e o parâmetro F_p foi substituído na fórmula por F_m . Do parâmetro Φ'_{ft} , foi também estimado o número de doadores de pólen por, $N_{ft} = \Phi'_{ft} / (1 - F_m)$ (SMOUSE et al., 2001). Seguindo a metodologia de Austerlitz e Smouse (2001b; 2002), foi estimado o valor global do parâmetro Φ_{ft} e da distância de dispersão de pólen ($\hat{\delta}$), assumindo duas curvas de dispersão: uma curva normal e uma exponencial para a densidade de árvores masculinas reprodutivas do pomar ($d=0.0045$). A área efetiva de vizinhança de polinização (\hat{A}_{ep}) foi calculada assumindo distribuição de pólen circular homogênea ao redor de cada árvore matriz, de raio igual a distância de dispersão de pólen, $\hat{A}_{ep} = \sqrt{\hat{\delta} / 3.1415}$.

Resultados e discussão

Taxa de imigração de pólen

Foram observados baixos níveis de imigração de pólen no pomar. Das 638 sementes tipadas para os cinco locos isoenzimáticos, apenas seis (cerca de 1 %) apresentaram discordância com o genótipo das 45 árvores masculinas do pomar. Esse resultado era esperado, visto que não existem outros exemplares da espécie próximos ao pomar. Contudo, o poder de exclusão de um candidato a pai, quando este não é o verdadeiro pai, para o conjunto de locos utilizados foi extremamente baixo (0,520, variando entre locos de 0,035 a 0,284). A causa pode ser atribuída ao limitado número de locos usados e baixo polimorfismo destes locos.

Comparativamente a outros estudos de imigração ou contaminação de pólen em pomares de sementes de espécies arbóreas, a taxa aqui detectada é a mais baixa já reportada. Foram encontrados na literatura 4,3 % de contaminação em um pomar clonal de *Abies nordmanniana* (HANSEN; KJAER, 2006) e 5 % para *Pinus contorta* var. *latifolia* (STOEHR; NEWTON, 2002), geralmente essas taxas são superiores, como por exemplo, os relatados em pomares de sementes de *Picea abies* 16 %, (XIE; KNOWLES, 1993), *Pinus pinaster* 36 %, (PLOMION et al., 2001) e *Pseudotsuga menziesii* mínimo 31 %.

Freqüências alélicas do óvulo e pólen

A estimativa das divergências entre as freqüências alélicas do pólen e dos óvulos mostrou diferenças significativas para os locos *PGI-B* e *6-PGDH-B* ao nível de 0,1 % de probabilidade (Tabela 1). De acordo com a comparação nas freqüências alélicas das árvores masculinas e femininas (Tabela 1), existem diferenças genéticas significativas entre os sexos para o loco *G-6PDH-A*. Nas fêmeas, o alelo A_1 foi predominante, enquanto nos machos, as freqüências dos alelos A_1 e A_2 foram semelhantes. Contudo, isto não explica os desvios observados nos locos *PGI-B* e *6-PGDH-B*. Acredita-se que, neste caso, as divergências entre as freqüências de pólen e óvulo ocorram devido ao cruzamento entre indivíduos aparentados, cruzamentos biparentais e/ou assincronia do período de florescimento.

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

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

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

Homogeneidade nas freqüências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas

Apenas o loco *G-6PDH-A* apresentou divergência genética significativa ($P < 0,01$) entre as freqüências alélicas do pólen efetivo e das árvores masculinas (Tabela 1), indicando que o pólen efetivo não representa as freqüências alélicas da população masculina. Este resultado pode ser indicativo de desvios de cruzamentos aleatórios, visto que nem todas as árvores masculinas contribuíram de forma homogênea para a descendência. Diversos fatores podem ser responsáveis por essa divergência, dentre eles: cruzamentos biparentais, que podem estar associados às vizinhanças de polinização; variação espacial e temporal na fenologia de florescimento e fecundidade; e a proporção de árvores adultas, contribuindo efetivamente no processo reprodutivo (MURAWSKI et al., 1991). Outra causa pode ser a presença de cruzamentos correlacionados.

Endogamia no pomar

A estimativa do índice de fixação foi positiva e não significativamente diferente de zero na população adulta ($\hat{F}_a = 0,061$), mas positiva e significativa nas progênies ($\hat{F}_p = 0,105$; $P < 0,05$), indicando endogamia e sugerindo a ocorrência de seleção contra homozigotos entre as fases de sementes e adulta (Tabela 2). Em espécies dióicas como *I. paraguariensis*, a causa de endogamia é o cruzamento entre indivíduos parentes (endogamia biparental). Como em espécies dióicas o coeficiente de endogamia nas progênies é igual ao coeficiente de coancestria entre os parentais cruzados, é possível afirmar que a endogamia de 0,105 (Tabela 2) foi gerada pelo cruzamento entre parentes aproximadamente no grau de meios-irmãos ($\theta_{xy} = 0,125$). Isto indica que embora o pomar tenha sido desbastado, permanecem indivíduos parentes de sexos opostos e que está ocorrendo a reprodução entre estes.

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

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

Parâmetros	Estimativas
Diferenciação no conjunto de pólen: Φ_{ft}	0,149 (0,038 a 0,20)
Diferenciação corrigida no conjunto de pólen: $\Phi'_{ft} = \hat{\Phi}_{ft} / (1 + \hat{F}_m)$	0,132 (0,027 a 0,18)
Número efetivo de árvores polinizadoras: $\hat{N}_{ep} = 1 / 2\hat{\Phi}'_{ft}$	3,8 (2,7 a 18,5)
Média da distância de dispersão de pólen: modelo normal: δ_{normal} (m)	14,1
Média da distância de dispersão de pólen: modelo exponencial: $\delta_{exponencial}$ (m)	15,9
Área de vizinhança de dispersão de pólen: modelo normal: $A_{ep(normal)}$ (ha)	0,06
Área de vizinhança de dispersão de pólen: modelo exponencial: $A_{ep(exponencial)}$ (ha)	0,08

(): $IC_{95\%}$ = intervalo de confiança do erro padrão (EP) a 95 % de probabilidade, $1,96EP$;

^a: Tipados para 5 locos.

Observa-se excesso significativo de heterozigotos nas fêmeas ($\hat{F}_{mat} = -0,200, P < 0,05$) e endogamia significativa nos machos ($\hat{F}_m = 0,125, P < 0,05$) (Tabela 2). Em espécies lenhosas dióicas, as fêmeas apresentam um esforço reprodutivo (florescimento e frutificação) superior aos machos, empregando grande parte dos seus recursos na reprodução e menos na manutenção e crescimento. Conseqüentemente, a taxa de mortalidade é superior nas fêmeas (LLOYD; WEBB, 1977). O excesso de heterozigotos observados nas fêmeas de *I. paraguariensis* poderia ser justificado pela morte prematura dos indivíduos endogâmicos, através da seleção natural, devido à menor capacidade adaptativa e ao reduzido vigor ou pela eliminação das fêmeas, supostamente homozigotas, menos produtivas da população, visto que foi realizada uma seleção em relação à produção de massa foliar.

Taxas de cruzamento multilocos e unilocos

As taxas de cruzamento multilocos e unilocos foram altas ($> 0,95$) e estatisticamente diferentes de um, a julgar pelo intervalo de confiança do erro a 95 % de probabilidade (Tabela 2). Em espécies dióicas, toda a diferença das taxas multilocos e unilocos pode ser atribuída aos cruzamentos entre indivíduos aparentados. A diferença entre a taxa de cruzamento multilocos da unidade ($1 - \hat{t}_m$), que no caso apresentou a menor estimativa de cruzamento, indicou a ocorrência de 4,5 % de cruzamentos entre indivíduos parentes. Isto explica a alta endogamia observada nas progênies e confirma que realmente ocorreram cruzamentos entre parentes no pomar.

Cruzamentos correlacionados

Os resultados indicaram alta taxa de cruzamentos biparentais ($\hat{r}_{p(m)} = 0,401$), e que aproximadamente 40 % das sementes de árvores individuais eram parentes no grau de irmãos-completos. Este resultado pode explicar os desvios observados entre as freqüências alélicas das árvores masculinas e do pólen que efetivamente fecundou as árvores matrizes, assim como as causas

dos cruzamentos biparentais que são as mesmas apresentadas neste tópico.

O número efetivo de árvores (N_{ep}) participando na polinização foi estimado em apenas três (2,5), demonstrando forte restrição na contribuição paterna (Tabela 2). Se no pomar os cruzamentos fossem perfeitamente aleatórios, todas as árvores masculinas contribuiriam para a descendência e as progênies seriam predominantemente de meios-irmãos.

Tamanho efetivo da variância

O coeficiente médio de coancestria dentro de progênies (Θ_{xy}) foi estimado em 0,186, valor este que é 32,8 % superior ao esperado em progênies de meios-irmãos (0,125). O tamanho efetivo de variância () médio para cada progênies foi estimado em 2,53. Este valor é 36,7 % inferior ao esperado em sementes coletadas de 37 árvores matrizes de uma população idealizada, onde o tamanho efetivo de variância corresponde a quatro ($\hat{N}_{e(v)} = 0,5 / \hat{\Theta}_{xy} = 0,5 / 0,125$). Desvios das pressuposições que caracterizam a população idealizada causam reduções no tamanho efetivo de variância.

$\hat{N}_{e(v)}$

Heterogeneidade no conjunto de pólen e número de doadores de pólen

A análise de variância do conjunto de pólen recebido por diferentes árvores matrizes detectou forte estrutura genética ($\hat{\Phi}_{ft} = 0,149$, $P < 0,05$). A diferenciação gênica no conjunto pode ser afetada pela estrutura genética espacial das árvores adultas, autofecundação e endogamia na população parental (AUSTERLITZ; SMOUSE, 2001a; SMOUSE; SORK, 2004). *I. paraguariensis* é dióica e, portanto, não ocorrem autofecundações, de forma que se descarta este fator como causa da alta heterogeneidade observada no conjunto de pólen. A presente população é também um pomar de sementes desbastado, a partir

de alta intensidade de seleção, de forma que se permanece alguma estruturação espacial ela é provavelmente fraca. Contudo, um alto grau de endogamia foi observado na população parental masculina (Tabela 2). Levando em conta este valor, a correção da medida de diferenciação genética entre o conjunto de pólen para o coeficiente de endogamia das árvores masculinas reduziu o valor de 0,149 para 0,132. Tal resultado sugere diferença significativa na distribuição do conjunto de pólen de árvore matriz para árvore matriz, reforçando os prévios resultados que indicam desvios de cruzamentos aleatórios dentro do pomar.

O número efetivo de árvores polinizadoras também foi estimado com o parâmetro Φ_{fi} (SMOUSE et al., 2001), por meio da análise

TwoGener, sendo igualmente baixo, . A pequena diferença entre os dois cálculos se deve ao método de estimativa dos valores. O modelo de cruzamentos correlacionados de Ritland (1989) usa um método de máxima verossimilhança para estimar a correlação de paternidade e, assim, explora melhor as informações multilocos. O modelo TwoGENER, por sua vez, estima este parâmetro indiretamente, a partir de um coeficiente de correlação intraclasse. Contudo, em termos práticos, ambos indicam que um baixo número de árvores polinizadoras (três a quatro árvores) fecundou cada árvore matriz.

Distância de fluxo de pólen e área de vizinhança de polinização

A estimativa da distância média de dispersão de pólen dentro do pomar foi relativamente baixa. A distância média calculada pelo modelo normal indica que o pólen é geralmente disperso dentro de uma área de vizinhança de polinização de 0,06 ha, ou dentro de um círculo com um raio de 14,1 m. A aplicação do modelo exponencial indicou uma área de polinização um pouco maior. Para este modelo, a área de vizinhança foi estimada em 0,08 ha, ou uma área circular de raio igual a 15,9 m. A área de vizinhança de polinização estimada para o modelo exponencial corresponde a apenas 10 % da área total do pomar, indicando

uma forte limitação na distribuição do pólen. As causas podem ser o assincronismo no florescimento e comportamento dos polinizadores visitando preferencialmente árvores próximas.

Conclusões

1. O pomar de sementes apresenta alto grau de isolamento de pólen externo;
2. A reprodução no pomar de sementes de *I. paraguariensis* envolve cruzamentos entre indivíduos aparentados e cruzamentos biparentais, gerando progênies de polinização aberta com alto grau de parentesco e endogamia;
3. Existe forte heterogeneidade genética no conjunto de pólen recebido por diferentes árvores maternas;
4. A área efetiva de vizinhança de polinização dentro do pomar é restrita, corresponde a aproximadamente 10 % da área total compreendida pelo pomar;
5. É necessária a realização de uma nova seleção no pomar, no sentido de eliminar árvores parentes de sexos diferentes;
6. O tamanho efetivo de variância das sementes coletadas do pomar é menor do que o tamanho efetivo potencial do pomar.

Referências

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P. E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. IV. Estimating the dispersal parameters. **Genetics**, Bethesda, v. 161, p. 355-363, 2002.

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P. E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. III. Impact of adult population structure. **Genetics Resources**, Cambridge, v. 78, p. 271-280, 2001a.

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P. S. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φ_{fi} , pollen dispersal and inter-female distance. **Genetics**, Bethesda, v. 157, p. 851-857, 2001b.

COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lancaster, n. 23, p. 72-84, 1969.

- COTTRELL, J. E.; WHITE, I. M. S. The use of isozyme genetic markers to estimate the rate of outcrossing in a sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) seed orchard in Scotland. **New Forest**, v. 10, p. 111-122, 1995.
- FERREIRA, A. G.; KASPARY, R., FERREIRA, H. B.; ROSA, L. M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Florestal**, Brasília, DF, ano 13, n. 53, p. 29-33, 1983.
- HANSEN, O. K.; KJAER, E. D. Paternity analysis with microsatellites in a Danish *Abies nordmanniana* clonal seed orchard reveals dysfunctions. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 36, p. 1054-1058, 2006.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: versão 1.1 para Windows 95/NT**. 1999. Disponível: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>>. Acesso em: 25 set. 2003.
- LLOYD, D. G.; WEBB, J. Secondary sex characters in plants. **Botanical Review**, New York, v. 43, p. 177-216, 1977.
- MACCARI JUNIOR, A. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial de Cadeia Produtiva da Erva-mate, 2000. 160 p. (Série PDACT, 1).
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, London, v. 7, p. 639-635, 1998.
- MORIGUCHI, Y.; TAIRA, H.; TANI, N.; TSUMURA, Y. Variation of paternal contribution in a seed orchard of *Cryptomeria japonica* determined using microsatellite markers. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 34, p. 1683-1690, 2004.
- MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, London, v. 67, p. 167-174, 1991.
- PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; POT, D.; VENDRAMIN, G.; GERBER, S.; DECROOQ, S.; BRACH, J.; RAFFIN, A.; PASTUSZKA, P. Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 31, p. 1816-1825, 2001.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Erva-mate. In: _____. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988. p. 284-292.
- RESENDE, M. D. V. de; STURION, J. A.; MENDES, S. **Genética e melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1995. 33 p. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 25).

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v. 43, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Version 3.1. University of British Columbia, Canada. Free program distributed by the authors from. Disponível em: <<http://kritland@interchange.ubc.ca>>. Acesso: 30 jan. 2004.

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

RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y. A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 71, p. 375-384, 1985.

SMOUSE, P. E.; DYER, R. J.; WESTFALL, R. D.; SORK, V. L. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete Heterogeneity among females. **Evolution**, Lancaster, v. 55, 260-271, 2001.

SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, p. 21-38, 2004.

SOUSA, V. A.; DAROS, T. L.; STURION, J. A. Fenologia reprodutiva de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 9., 2003. Nova Prata. **Floresta: função social: anais**. Nova Prata: Prefeitura Municipal, 2003. 1 CD ROM.

SOUSA, V. A.; SEBBENN, A. M.; ZIEHE, M.; HATTEMER, H. Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Forest Genetics**, Svolen, v. 12, p. 107-119, 2005.

STOEHR, M. U.; NEWTON, C. H. Evaluation of mating dynamics in a lodgepole pine seed orchard using chloroplast DNA markers. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 32, p. 469-476, 2002.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer, 1996. 445 p.

WENDT, S. N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 2005. 165 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

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

XIE, C. Y.; KNOWLES, P. Mating system and effective pollen immigration in a Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) plantation. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 48-52, 1993.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1988. 7 p. (EMBRAPA-CNPF. Circular Técnica, 16).